

**Wegener'sche Granulomatose: Untersuchungen zur Rolle zytoplasmatischer
Neutrophilen-Autoantikörper und deren Zielantigen Proteinase 3 sowie
Neutrophilen-Elastase bei Entzündungsprozessen in der Maus**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Heiko Pfister

aus

Tauberbischofsheim

Würzburg 2002

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Rainer Hedrich

Gutachter : Dr. med. habil. Dieter E. Jenne

Gutachter : Prof. Dr. Erich Buchner

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die Versuche zur vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von April 1998 bis August 2001 in der Arbeitsgruppe von Dr. med. habil. Dieter E. Jenne, Abteilung für Neuroimmunologie am Max-Planck-Institut für Neurobiologie in Martinsried durchgeführt.

Ich erkläre hiermit, diese Arbeit selbständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Die Arbeit wurde nach den alten Regeln der Rechtschreibung und Interpunktion verfaßt.

Martinsried, den 12. Februar 2002

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Dr. Dieter Jenne für die Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Erich Buchner sei für die Begutachtung und Betreuung dieser Arbeit seitens der Universität Würzburg gedankt.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Monika Bradl für Ihr immer offenes Ohr und ihre engagierte Diskussionsbereitschaft. Ihr und Mark Hübener sei überdies für die Übernahme der Aufgaben des Promotionskommittees gedankt.

Dr. Wolfgang Klinkert und Dr. Klaus Dornmair sei gedankt für die Hilfestellungen und Tips in der Proteinchemie und FACS-Analysen. Dr. Antonio Iglesias danke ich für seine Tips im Bezug auf alles was mit humoraler Immunität zu tun hat.

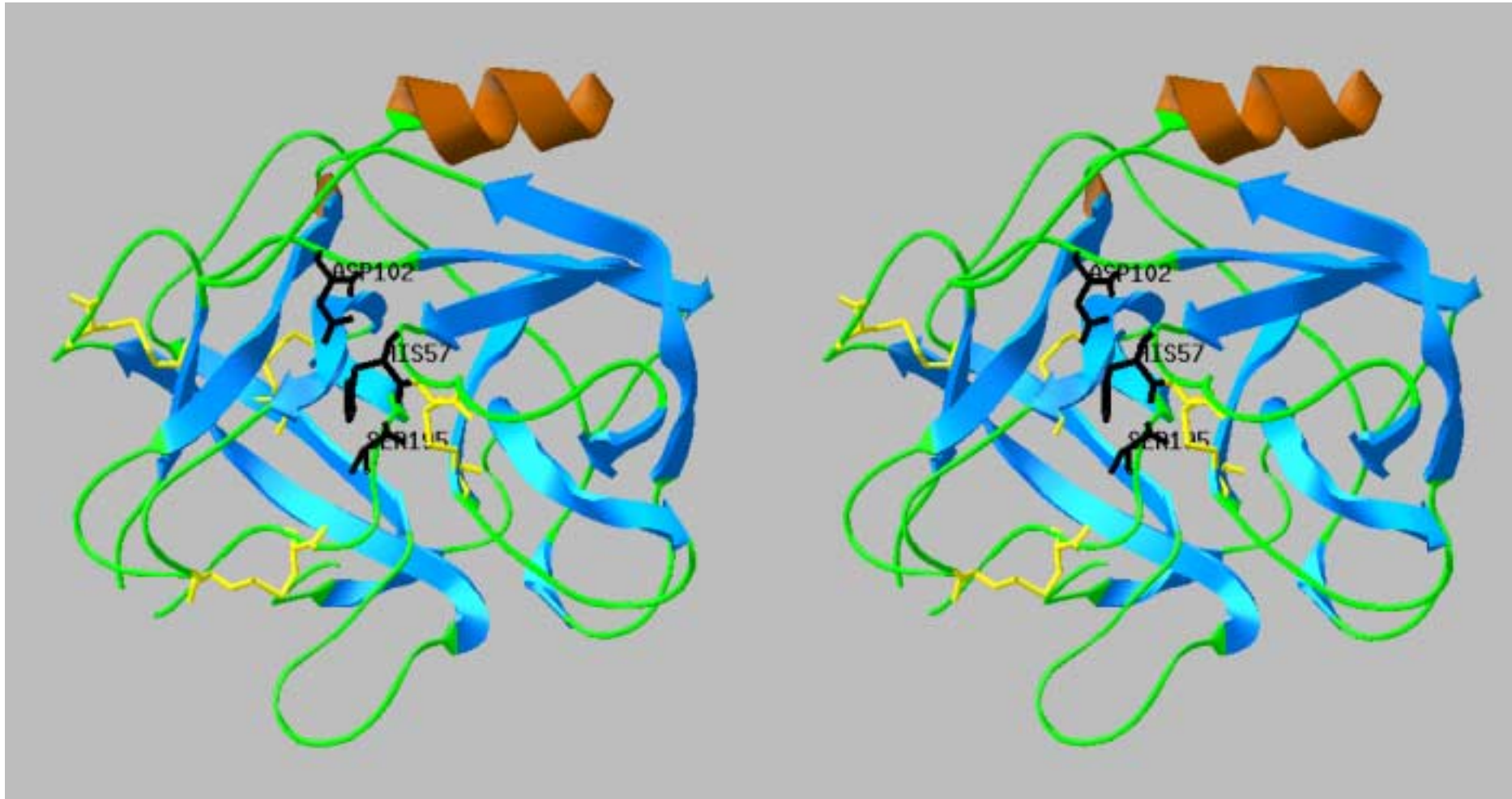
Monika Falkenberg und Beate Heuser danke ich für die Herstellung histologischer Präparate.

Prof. Dr. Markus Ollert und Prof. Dr. Ulrich Specks sei für die lange dauernde intensive Zusammenarbeit gedankt.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Leticia Quintanilla-Fend für die zügige Erstellung der pathologischen Gutachten.

Herzlich gedankt sei allen Kollegen der Abteilung für Neuroimmunologie die hier namentlich nicht aufgeführt wurden. Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen Kollegen aus N136/N137 für die gute (Labor)gemeinschaft bedanken, dies gilt im besonderen für Lisa Stegmann, Heike Reimann, Elke Wilharm, Clara Hink-Schauer und Wolfgang Lasinger, dem hier gesondert noch einmal für die Betreuung der Tiere und seine Hilfe beim Zellenzählen und der histologischen Auswertungen gedankt sei.

Nicht zuletzt (und diesmal wirklich) sei einer merkwürdigen, haarigen Gestalt aus einem fremden Gebirgszug gedankt, die einen wesentlichen Beitrag zur Identitätsfindung mit Hilfe von Teppichen, Musikinstrumenten und ein wenig Gallerte (Collagen!) geleistet hat.



Stereobild der Kristallstruktur humaner PR3.

Um das Autoantigen der Wegener'schen Granulomatose 3-dimensional zu erschließen, bitte das Bild etwa 50 cm entfernt halten und zwischen beiden Kristallmodellen „hindurchschauen“. Mit etwas Übung ergibt sich nach einer Weile ein räumlich-plastischer Eindruck der Kristallstruktur. Das Bild wurde mit dem pdb-viewer (Glaxo-Wellcome) hergestellt. Die C-terminale Helix ist rot-braun, Faltblattstrukturen sind blau dargestellt. Cysteinreste (gelb) und die katalytische Triade (His-57, Asp-102, Ser-195) sind im Detail wiedergegeben.

Inhalt

| | |
|---|-------------|
| Summary | X |
| Zusammenfassung | XIII |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 KLASSIFIZIERUNG SYSTEMISCHER IDIOPATHISCHER VASKULITIDEN..... | 1 |
| 1.2 ANTINEUTROPHILE ZYTOPLASMATISCHE AUTOANTIKÖRPER (ANCA) | 2 |
| 1.3 WEGENER'SCHE GRANULOMATOSE | 4 |
| 1.4 C-ANCA IN DER WEGENER'SCHEN GRANULOMATOSE..... | 6 |
| 1.5 WEGENER'S AUTOANTIGEN: PROTEINASE 3 | 9 |
| 1.6 GEWINNUNG FUNKTIONELLER, REKOMBINANTER PROTEINE AUS <i>E. COLI</i> | 12 |
| 1.7 DIE ARTHUS-REAKTION | 15 |
| 1.8 ZIELSETZUNG..... | 16 |
| 2 Material | 17 |
| 2.1 CHEMIKALIEN UND ENZYME | 17 |
| 2.2 GERÄTE | 17 |
| 2.3 BAKTERIENSTÄMME | 18 |
| 2.4 MAUSSTÄMME | 18 |
| 2.5 REKOMBINANTE PLASMIDE UND VEKTOREN | 18 |
| 2.6 OLIGONUKLEOTIDE..... | 19 |
| 3 Methoden..... | 21 |
| 3.1 PLASMIDISOLIERUNG AUS <i>E. COLI</i> [26] | 21 |
| 3.2 DNA-AMPLIFIZIERUNG (PCR) | 21 |
| 3.3 DNA-RESTRIKTIONSVERDAU | 21 |
| 3.4 HORIZONTALE AGAROSE-GELELEKTROPHORESE | 22 |
| 3.5 DNA-ISOLIERUNG AUS AGAROSEGELEN..... | 22 |
| 3.6 BESTIMMUNG VON DNA-KONZENTRATIONEN..... | 22 |
| 3.7 LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN | 22 |
| 3.8 KLONIERUNG DER EXPRESSIONSKONSTRUKTE | 23 |
| 3.9 DNA-TRANSFORMATION..... | 23 |
| 3.9.1 <i>CaCl₂-vermittelte Transformation [62, 69]</i> | 23 |
| 3.9.2 <i>Elektrotransformation [136, 84]</i> | 24 |
| 3.10 DNA-SEQUENZANALYSE..... | 24 |
| 3.11 REKOMBINANTE PROTEINEXPRESSION IN <i>E. COLI</i> | 24 |
| 3.11.1 <i>Isolation der Einschußkörperchen („inclusion body“-Präparation)</i> | 25 |
| 3.11.2 <i>Solubilisierung der Proteinaggregate</i> | 25 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.11.3 | <i>Renaturierung von solubilisiertem Protein</i> | 26 |
| 3.11.4 | <i>Reinigung von renaturierter rmPR3 über FPLC</i> | 27 |
| 3.11.5 | <i>Aktivierung von rmPR3</i> | 27 |
| 3.12 | GRÖßENBESTIMMUNG VON PROTEINEN DURCH SDS-POLYACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESE (SDS-PAGE) | 27 |
| 3.13 | PROTEINDETEKTION..... | 28 |
| 3.13.1 | <i>Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blue [100, 209, 340]</i> | 28 |
| 3.13.2 | <i>Proteinfärbung mit Silbernitrat [28]</i> | 28 |
| 3.13.3 | <i>Western-Blot Analyse von Proteinen [318, 39]</i> | 29 |
| 3.14 | PROTEINSEQUENZIERUNG [85] | 30 |
| 3.15 | COLORIMETRISCHE PROTEINQUANTIFIZIERUNG [234]..... | 30 |
| 3.16 | SPEKTROPHOTOMETRISCHE PROTEINQUANTIFIZIERUNG [189]..... | 30 |
| 3.17 | BESTIMMUNG DER ENZYMATISCHEN AKTIVITÄT VON REKOMBINANTER MPR3 | 31 |
| 3.18 | KOVALENTE KOPPLUNG VON hNE AN CYANOGENBROMID-AKTIVIERTE SEPHAROSE | 31 |
| 3.19 | STRUKTURMODELLIERUNG VON MPR3 | 31 |
| 3.20 | TIEREXPERIMENTELLE METHODEN | 32 |
| 3.20.1 | <i>Tierhaltung</i> | 32 |
| 3.20.2 | <i>Genetische Charakterisierung von Zuchtmäusen</i> | 32 |
| 3.21 | HERSTELLUNG POLYKLONALER MPR3-ANTISEREN IN PR3/NE-DEFIZIENTEN MÄUSEN | 34 |
| 3.21.1 | <i>Immunisierung</i> | 34 |
| 3.21.2 | <i>Herstellung von Serum</i> | 35 |
| 3.22 | PASSIVE IMMUNISIERUNG VON WILDTYP-MÄUSEN | 35 |
| 3.23 | BLUTBILDANALYSE | 35 |
| 3.24 | GEWINNUNG VON NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN AUS DER PERITONEALHÖHLE | 36 |
| 3.24.1 | <i>Gewinnung von Peritonealzellen</i> | 36 |
| 3.24.2 | <i>Isolation von neutrophilen Granulozyten aus Peritonealflüssigkeit [90]</i> | 37 |
| 3.24.3 | <i>Herstellung eines Lysats von neutrophilen Granulozyten für den Western Blot</i> | 37 |
| 3.25 | FESTPHASENIMMUNOASSAY (“ELISA”, ”ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY”, [91]) | 37 |
| 3.26 | DURCHFLUßZYTOMETRIE..... | 38 |
| 3.26.1 | <i>Durchflußzytometrische Identifikation von neutrophilen Granulozyten</i> | 39 |
| 3.26.2 | <i>Durchflußzytometrische Detektion von membranständiger PR3 auf partiell stimulierten Neutrophilen</i> | 39 |
| 3.26.3 | <i>Quantitative Analyse der Phagozytosekapazität von neutrophilen Granulozyten in Vollblut ...</i> 40 | |
| 3.27 | REVERSE PASSIVE ARTHUS-REAKTION (RPA, [4]) | 40 |
| 3.27.1 | <i>Reverse passive Arthus-Reaktion in der Haut</i> | 41 |
| 3.27.2 | <i>Reverse passive Arthus-Reaktion in der Peritonealhöhle</i> | 41 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.28 | INDUKTION EINER LOKALEN INFLAMMATORISCHEN REAKTION IN DER HAUT DURCH INJEKTION VON TNF α | 41 |
| 3.29 | QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON TNF α | 42 |
| 3.30 | TRANSFER VON KNOCHENMARKSZELLEN OVALBUMIN-IMMUNISIERTER NE/PR3-DEFIZIENTER MÄUSE | 42 |
| 3.30.1 | <i>Immunisierung von Spendermäusen mit Aluminiumhydroxid-adsorbiertem Ovalbumin</i> | 43 |
| 3.30.2 | <i>Isolation von Knochenmarkszellen und Transfer auf naive Mäuse</i> | 43 |
| 3.30.3 | <i>Quantifizierung spezifischer Immunglobulin-sezernierender Plasmazellen („ELISPOT“, enzyme linked immunospot assay [68, 278])</i> | 43 |
| 3.31 | HERSTELLUNG VON ORGAN- UND HAUTPRÄPARATEN FÜR HISTOLOGISCHE ANALYSEN | 44 |
| 3.31.1 | <i>Organentnahme und Fixierung</i> | 45 |
| 3.31.2 | <i>Herstellung von Gefrierschnitten</i> | 45 |
| 3.31.3 | <i>Färbung von Gefrierschnitten mit Hämalaun/Eosin</i> | 45 |
| 3.32 | DETEKTION VON ANTI-NEUTROPHILEN-ANTIKÖRPERN MIT HILFE INDIREKTER IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG [345] | 46 |
| 3.33 | QUANTITATIVE BESTIMMUNG DES AKTIVIERUNGSZUSTANDES NEUTROPHILER GRANULOZYTEN ... | 46 |
| 3.33.1 | <i>Quantitative Bestimmung intrazellulärer, oxidativer Sauerstoffverbindungen</i> | 47 |
| 3.33.2 | <i>Quantitative Bestimmung freigesetzten Superoxids [206]</i> | 47 |
| 3.34 | STATISTISCHE AUSWERTUNG | 47 |
| 4 | Ergebnisse | 49 |
| 4.1 | PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG PR3/NE-DEFIZIENTER MÄUSE | 49 |
| 4.1.1 | <i>Bestimmung der Anzahl von neutrophilen Granulozyten in peripherem Blut</i> | 50 |
| 4.2 | VERGLEICHENDE, QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER PHAGOZYTLOSELEISTUNG NEUTROPHILER GRANULOZYTEN VON WILDTYP- UND PR3/NE-DEFIZIENTEN MÄUSEN | 51 |
| 4.3 | REVERSE, PASSIVE ARTHUS-REAKTION | 55 |
| 4.3.1 | <i>Reverse, passive Arthus-Reaktion in der Haut</i> | 55 |
| 4.3.2 | <i>Immunkomplexperitonitis</i> | 59 |
| 4.4 | HERSTELLUNG REKOMBINANTER MPR3 | 61 |
| 4.4.1 | <i>Rekombinante Expression von pro-mPR3 in E. coli</i> | 61 |
| 4.4.2 | <i>Solubilisierung und Renaturierung von pro-rmPR3</i> | 66 |
| 4.4.3 | <i>Konvertierung von pro-rmPR3 zu katalytisch aktiver rmPR3</i> | 68 |
| 4.5 | BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG VON PRO-RMPR3 BZW. RMPR3 | 70 |
| 4.5.1 | <i>Konvertierte pro-rmPR3 ist katalytisch aktiv</i> | 70 |
| 4.5.2 | <i>Pro-rmPR3 und rmPR3 wird von humaner Neutrophilen-Elastase gespalten</i> | 71 |
| 4.6 | GENERIERUNG EINES MPR3-ANTIKÖRPERSPIEGELS IN WILDTYP-MÄUSEN | 76 |
| 4.6.1 | <i>Immunisierung von PR3/NE-defizienten Mäusen mit rmPR3</i> | 76 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.6.2 | <i>Bestimmung der Spezifität des gewonnenen Antiserums</i> | 78 |
| 4.6.3 | <i>IgG aus pro-rmPR3- und rmPR3-Antiserum binden an oberflächenexponierte PR3-Epitope</i> | 81 |
| 4.6.4 | <i>Pro-rmPR3-Antiserum induziert keinen nachweisbaren “oxidativen burst” neutrophiler Granulozyten</i> | 83 |
| 4.6.5 | <i>Übertragung der Anti-mPR3-Immunität von PR3/NE-defizienten Mäusen auf kongene Wildtyp-Tiere</i> | 86 |
| 4.7 | MURINE C-ANCA (MC-ANCA) VERSTÄRKEN EINE LOKALE ENTZÜNDUNGSREAKTION IN DER HAUT | 93 |
| 5 | Diskussion | 98 |
| 5.1 | PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG PR3/NE-DEFIZIENTER MÄUSE | 98 |
| 5.2 | REVERSE, PASSIVE ARTHUS-REAKTION IN DER HAUT | 101 |
| 5.3 | IMMUNKOMPLEXPERITONITIS..... | 103 |
| 5.4 | REKOMBINANTE EXPRESSION VON MPR3 | 105 |
| 5.5 | IN PR3/NE-DEFIZIENTEN MÄUSEN LASSEN SICH MURINE C-ANCA GENERIEREN..... | 114 |
| 5.6 | SYSTEMISCH VERABREICHTE MC-ANCA-SEREN INDUZIEREN IN WILDTYP-MÄUSEN KEINE SYMPTOME DER WEGENER’SCHEN TRIAS | 116 |
| 5.7 | MC-ANCA VERSTÄRKEN EINE LOKALE ENTZÜNDUNGSREAKTION..... | 122 |
| 5.8 | AUSBLICK | 123 |
| 6 | Literatur | 125 |
| 7 | Abkürzungen und chemische Formeln | 146 |
| 8 | Anhang | 150 |

Summary

Wegener's granulomatosis (WG) is an autoimmune disorder typically characterized by chronic inflammation of the upper respiratory tract, vasculitis and glomerulonephritis. WG belongs to the group of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody (ANCA) associated vasculitides with no or very few immune complex deposits ("pauci-immune") in affected organs. "Classic" ANCA (c-ANCA) that produce a cytoplasmic staining pattern on neutrophils are a specific seromarker for this disease entity. They recognize conformational epitopes of proteinase 3 (PR3) from azurophil granules of neutrophil granulocytes. The correlation of PR3-specific antibody titers and disease course suggests that they are an important pathogenic factor for this autoimmune disease. The hypothesis is supported by *in vitro* experiments demonstrating an interaction of c-ANCA with cytokine primed neutrophils resulting in full activation manifested by degranulation and respiratory burst. It has been shown that c-ANCA can also directly induce the loss of endothelial barrier functions. However, direct evidence for the pathogenic potential of c-ANCA *in vivo* has not been published yet. The central aim of this study is to clarify the role of c-ANCA in WG.

Since antibodies directed against human PR3 do not crossreact with the murine homolog, mPR3-specific antibodies were necessary to provide direct proof for c-ANCA mediated tissue damage in a murine disease model. Hence, sufficient amounts of recombinant murine PR3 (mPR3) were necessary to generate mPR3 specific murine antibodies. Several attempts have been made to produce recombinant PR3 in prokaryotic and eukaryotic host systems. But conformational epitopes recognized by c-ANCA are not well preserved on recombinant PR3 derived from *E. coli*, *P. pastoris*, or baculovirus-infected insect cells described in the literature so far. While recombinant human PR3 expressed in eukaryotes is well recognized by c-ANCA, the yield of both active human and murine PR3 generated in eukaryotic expression systems is very low. To obtain sufficient amounts of correctly folded recombinant murine proteinase 3 (rmPR3) for multiple immunizations of PR3/NE-deficient mice, rmPR3 was produced as inclusion body material in *E. coli* as a catalytically inactive precursor molecule. After *in vitro* refolding the N-terminal propeptide was removed by limited proteolysis with the dipeptidylaminopeptidase cathepsin C yielding catalytically active enzyme. Due to its catalytic activity that could be inhibited by the physiologic inhibitor of human PR3, α 1-antitrypsin, but not by secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI), the recombinant material was assumed to harbour the correct conformation after refolding.

To test, if anti-rmPR3 antibodies were sufficient to induce symptoms characteristic for WG, anti-PR3 antiserum was generated by immunization of PR3/neutrophil elastase (NE)-deficient mice with recombinant, refolded mPR3 or its zymogen. Specificity of the obtained sera was confirmed by ELISA, Western Blotting and indirect immunofluorescence. Moreover, antisera bound to the membranes of primed murine neutrophils as determined by flow cytometry. The generated antisera thus fulfilled the criteria defining c-ANCA positive sera of WG patients with respect to antigen specificity.

If anti-PR3 antibodies are sufficient to induce symptoms characteristic for WG, transfer of antiserum to wildtype mice should induce vasculitis and/or glomerulonephritis. By repetitive intravenous injection of antiserum from immunized mice a persisting antibody titer was generated in naïve wild type mice over a treatment period of 10 weeks. Lung and kidney of these mice were analyzed histologically but neither granuloma or vasculitis were found in the lungs nor glomerulonephritis or vasculitis was observed in the kidneys. This result suggests that c-ANCA alone are not sufficient to induce WG symptoms in the mouse.

Our initial observations were not surprising since the current hypothetical concept of c-ANCA-induced vasculitis implies that a primary inflammatory stimulus provided by cytokines like $\text{TNF}\alpha$ is required for the target antigen to be expressed on the plasma membrane of neutrophils. Exposure of the target antigen enables the binding of c-ANCA and subsequently triggers neutrophil activation. Consequently, this model, that was primarily deduced from *in vitro* experiments, was adapted to a model of local inflammation in the mouse: A mild inflammation was induced by repetitive local injection of $\text{TNF}\alpha$ into the skin. This inflammatory reaction increased significantly in the presence of rmPR3-antibodies. Our experimental data thus confirm the current concept that ascribes a pathogenic potential to c-ANCA.

A second aspect addressed in this work is the contribution of the two neutrophil serine proteases NE and PR3 to the generation of inflammatory processes. With respect to the mechanisms involved in the pathogenesis of WG, NE and PR3 may be of particular importance due to their ability to degrade extracellular matrix proteins, induction of apoptosis in endothelial cells, and the regulation of inflammatory processes by a variety of mechanisms. A local reverse passive Arthus reaction (RPA) was chosen as a model of a type III hypersensitivity reaction to reveal quantitative differences of inflammation in PR3/NE-deficient mice and congenic wild type mice. Wild type mice reacted significantly stronger than PR3/NE-deficient mice as determined by examination of local edema and hemorrhage intensity. It remains to be determined if the observed phenotype *in vivo* reveals a concerted effect of both serine proteases or if deficiency of one of the proteases alone accounts already

Summary

for this phenotype. Experimental data presented in this work are consistent with the hypothesis that PR3 and NE may directly interact: When recombinant mPR3 was incubated with hNE, a cleavage of mPR3 was observed that is apparently associated with changes in enzymatic activity. The physiologic relevance of this finding has to be defined in further studies. In summary, this work adds to the current understanding of the role of PR3 in WG: PR3 is not only the relevant autoantigen whose interaction with c-ANCA contributes to the fatal outcome of the disease but also contributes together with neutrophil elastase to tissue damage by its lytic activity and pleiotropic effects on inflammatory reactions.

Zusammenfassung

Die Wegener'sche Granulomatose (WG) ist eine Autoimmunerkrankung, die sich typischerweise als chronische Entzündung des oberen Respirationstraktes, Vaskulitis und Glomerulonephritis manifestiert. WG gehört zur Gruppe der sog. "pauci-immunen" Vaskulitiden, die mit Anti-Neutrophilen-Antikörpern (ANCA, *anti neutrophil cytoplasmic antibody*) assoziiert sind. Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz lassen sich ANCA im Serum der meisten WG-Patienten nachweisen. Die mit WG assoziierten sog. "klassischen" ANCA (c-ANCA) erkennen spezifisch Konformationsepitope der Serinprotease Proteinase 3 (PR3), die in den azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten gespeichert wird. Die enge Korrelation PR3-spezifischer Antikörperspiegel mit dem Krankheitsverlauf läßt vermuten, daß sie bei der Pathogenese eine zentrale Rolle spielen könnten. Diese Hypothese wird von Daten aus *in vitro* Experimenten gestützt: werden Zytokin-stimulierte neutrophile Granulozyten mit Patientenserum oder isolierten c-ANCA inkubiert, erfolgt eine Aktivierung der Neutrophilen, die sich durch Degranulation und Freisetzung von Sauerstoffradikalen äußert. c-ANCA können so indirekt - aber vermutlich auch direkt - zur Endothelschädigung beitragen. Jedoch konnte bisher kein direkter Beweis des pathogenen Potentials von c-ANCA am Tiermodell erbracht werden. Um die Wirkung von c-ANCA an einem Mausmodell zu testen, war zunächst ein murines Maus-PR3- (mPR3) spezifisches Antiserum notwendig. Da humane c-ANCA nicht mit mPR3 kreuzreagieren, wurde für die Immunisierung von PR3/Neutrophilen-Elastase (NE)-defizienten Mäusen ein mPR3-Zymogen rekombinant in *E. coli* als Einschlußkörpermaterial (IB, *inclusion bodies*) hergestellt. Nach Renaturierung des IB-Materials *in vitro* wurde mit der Dipeptidylaminopeptidase Cathepsin C das N-terminale Propeptid abgespalten. Das gewonnene Enzym besaß die für PR3 und NE spezifische katalytische Aktivität, die durch den physiologischen Inhibitor humaner PR3, α 1-Antitrypsin, inhibiert werden konnte. Es ist daher anzunehmen, daß das gewonnene rekombinante Material die korrekte Konformation durch Renaturierung *in vitro* erhalten hatte.

Um nun die pathologische Wirkung von Anti-rmPR3-Antikörpern zu testen, wurden PR3/NE-defiziente Mäuse mit dem rekombinanten Zymogen (pro-rmPR3) oder der N-terminal prozessierten Form (rmPR3) immunisiert. Die Spezifität der gewonnenen Antiseren wurde durch Festphasenimmunoassay, *Western Blotting* und indirekte Immunfluoreszenzfärbung überprüft. Weiterhin konnte fluoreszenzzytometrisch die Bindung von Anti-mPR3-IgG an die Plasmamembran Zytokin-stimulierter Granulozyten nachgewiesen werden. Die hergestellten Antiseren erfüllten somit

die für c-ANCA-positive Seren von WG-Patienten typischen Eigenschaften hinsichtlich der Antigenspezifität.

Wenn c-ANCA alleine hinreichend für die Induktion der für WG charakteristischen Symptome sind, sollte der Antiserumtransfer auf Wildtyp-Mäuse WG-ähnliche Symptome in den Rezipienten hervorrufen. Nach wiederholter intravenöser Injektion von Serum pro-rmPR3-immunisierter Mäuse ließ sich ein signifikanter Antikörperspiegel bei Verdünnungen von 1:2000 über den gesamten Behandlungszeitraum von 10 Wochen in den Rezipienten nachweisen. Der anschließende histologische Befund von Niere und Lunge ergab jedoch keine pathologischen Veränderungen. Dieses Ergebnis legt nahe, daß c-ANCA alleine keine Krankheitssymptome hervorrufen.

In dem gegenwärtigen Modell für c-ANCA-vermittelte Vaskulitis entfaltet sich die pathogene Wirkung von c-ANCA vor allem dann, wenn neutrophile Granulozyten zusätzlich durch proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor α (TNF α) stimuliert werden. Erst die Stimulation der Granulozyten ermöglicht die Bindung von c-ANCA an die Plasmamembran und deren anschließende Aktivierung. Deshalb wurde dieses Modell, das vorwiegend aus Ergebnissen von Experimenten *in vitro* abgeleitet ist, auf ein lokales Entzündungsmodell der Maus übertragen: Durch wiederholte Injektion von TNF α in die Haut wurde eine leichte Entzündungsreaktion ausgelöst. Diese Entzündungsreaktion ließ sich schließlich durch intravenöse Verabreichung von pro-rmPR3- oder rmPR3-Antiserum verstärken. Dieser Befund ist ein wichtiger Beweis für die verbreitete Ansicht, daß c-ANCA nicht nur ein Epiphänomen der WG darstellen, sondern selbst ein pathogenes Potential besitzen.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Beteiligung der beiden Serinproteasen NE und PR3 an der Entstehung inflammatorischer Prozesse untersucht. Im Hinblick auf die bei der Pathogenese der WG beteiligten Mechanismen könnten PR3 und NE eine wichtige Rolle spielen. PR3 und NE können Proteine der extrazellulären Matrix abbauen, Apoptose in Endothelzellen induzieren und sind an der Regulation entzündlicher Prozesse über verschiedene Wirkmechanismen beteiligt. Um quantitative Unterschiede bei Entzündungsreaktionen zwischen NE/PR3-defizienten Mäusen und kongenen Wildtyp-Tieren zu untersuchen, wurde als Modell einer Typ III Hypersensitivitätsreaktion eine lokale passive Arthus-Reaktion induziert. Wildtyp-Mäuse entwickelten dabei eine deutlich stärkere lokale Entzündung als NE/PR3-defiziente Mäuse. Weitere Studien sind nötig um die Frage zu klären, ob eine der beiden Serinproteasen alleine oder in Kooperation mit der anderen diesen Phänotyp hervorruft. Für einen direkten synergistischen Effekt sprechen indes die Ergebnisse eines *in vitro* Experiments mit pro-rmPR3 und humaner NE: Bei Inkubation von pro-rmPR3 mit hNE wurde eine Spaltung des

Proenzym beobachtet, die mit einer Verstärkung der enzymatischen Bruttoaktivität einherging. Die physiologische Relevanz dieser Beobachtung muß allerdings noch geklärt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen im Einklang mit den neuesten Erkenntnissen über die Rolle der PR3 bei der Wegener'schen Granulomatose: PR3 dürfte sowohl aufgrund pleiotroper Effekte auf entzündliche Reaktionen als auch wegen seiner lytischen Eigenschaften zur Gewebeschädigung beitragen. Darüberhinaus konnte eine pathogene Wirkung von mPR3-spezifischen Antikörpern in der Maus nachgewiesen werden.

1 Einleitung

1931 berichtete Klinger als erster über Gefäßerkrankungen als Sonderform der Panarteriitis nodosa [175]. Der Pathologe Friedrich Wegener grenzte die „eigenartige rhinogene Granulomatose mit besonderer Beteiligung des Arteriensystems und der Nieren“ von der Panarteriitis nodosa ab [333]. 1954 schließlich führten Godman und Churg den Begriff Wegener'sche Granulomatose (WG) ein, dem die diagnostischen Kriterien der sog. Wegener'schen Trias Granulom, Vaskulitis und Glomerulonephritis zugrunde lagen [120].

1982 wurden von Davies und Mitarbeitern zum ersten mal bei 8 Patienten mit segmental nekrotisierender Glomerulonephritis zytoplasmatische, Anti-Neutrophilen-Antikörper beschrieben [75]. Van der Woude und andere schlugen 1985 schließlich als erste vor, das von Anti-Neutrophilen-Antikörpern (zunächst bezeichnet als *anti cytoplasmic antibody*, ACPA, später umbenannt in *anti neutrophil cytoplasmic antibody*, ANCA) hervorgerufene diffus granuläre zytoplasmatische Fluoreszenzmuster auf Neutrophilen als spezifisches diagnostisches Kriterium für die Wegener'sche Granulomatose einzusetzen [345].

1.1 Klassifizierung systemischer idiopathischer Vaskulitiden

Vaskulitiden bilden eine außerordentlich heterogene Gruppe entzündlicher Blutgefäßerkrankungen, die sich klinisch in unterschiedlichster Weise manifestieren. Der Entzündungsprozeß kann nahezu alle Blutgefäße betreffen und deshalb Auswirkungen auf fast alle Organe haben. Die Klassifizierung idiopathischer Vaskulitiden beruht im wesentlichen auf der Größe der primär betroffenen Gefäße (Abb. 1.1) [155].

Eine Untergruppe der primären oder idiopathischen Vaskulitiden bilden die sog. ANCA-assoziierten Vaskulitiden, zu denen unter anderem die Wegener'sche Granulomatose zu rechnen ist.

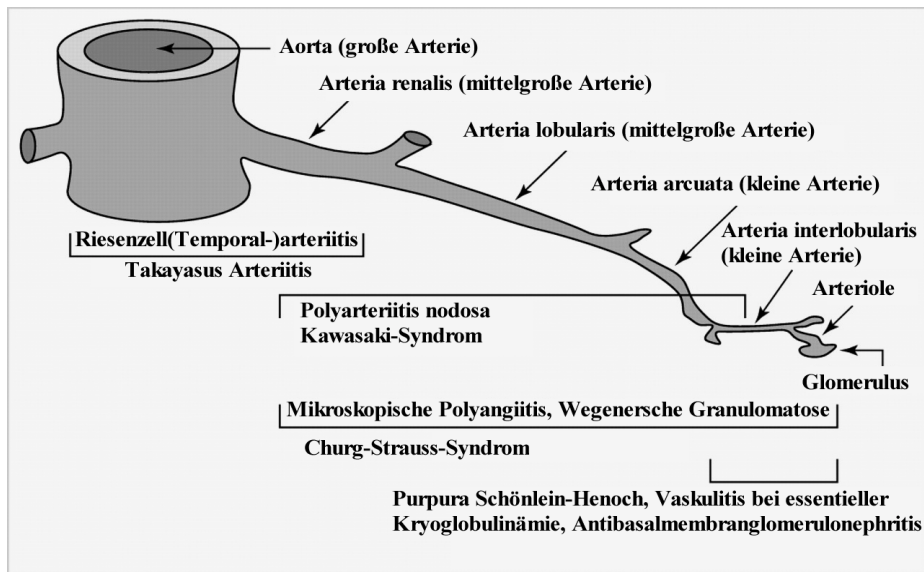
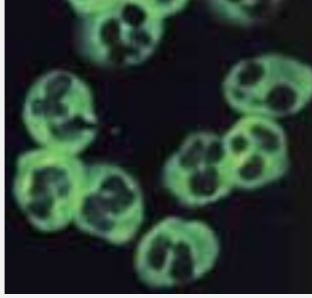



Abb. 1.1: Spektrum systemischer Vaskulitiden und die vorwiegend betroffenen Gefäßtypen nach ihrer Größe (hier dargestellt anhand der Gefäßtypen der Niere). Aus [272].

1.2 Antineutrophile zytoplasmatische Autoantikörper (ANCA)

ANCA sind vorwiegend gegen Enzyme gerichtet, die in den primären oder azurophilen Granula (Lysosomen) von neutrophilen Granulozyten lokalisiert sind. Auf Äthanol-fixierten Neutrophilen werden drei verschiedene Färbemuster in der indirekten Immunfluoreszenzfärbung unterschieden: c-ANCA, p-ANCA und x-ANCA oder a-ANCA (Tab.1.1).

Die Methode der indirekten Immunfluoreszenzfärbung von Äthanol- und Formaldehyd-fixierten neutrophilen Granulozyten dient bis heute als wichtigstes differentialdiagnostisches Kriterium, und wurde in neuerer Zeit durch Autoantigen-spezifische Festphasenimmunoassays ergänzt. Die Verwendung vernetzender Fixative (z. B. Paraformaldehyd, PFA) für die Präparation der Zellen führt zu einer Immobilisierung der ANCA-relevanten Antigene im Zytoplasma. Das p-ANCA-Muster stellt hingegen ein artifizielles Färbemuster auf Alkohol-fixierten Zellen dar: die Äthanol-Fixierung führt zu Veränderungen in den Granula-Membranen, was eine ionische Wechselwirkung zwischen kationischen Proteinen der Granula und der negativ geladenen Zellkernmembran ermöglicht. Die kombinierte Anwendung beider Techniken erlaubt die Differenzierung von ANA (*anti nuclear antibodies*), die gegen Bestandteile des Zellkerns, meist DNA oder DNA-assoziierte Proteine, gerichtet sind, und p-ANCA und c-ANCA (näheres hierzu s. Kap. 4.6.2 b).

| Akronym | Subtyp | Fluoreszenzmuster | Zielantigen |
|------------------|--------------------------------------|--|---|
| c-ANCA | Zytoplasmatische oder „classic“ ANCA | diffus granulär, z. T. zentral akzentuiert  | PR3 [154, 156], selten MPO [279] |
| p-ANCA | perinukleäre ANCA | perinukleär  | MPO [95], NE [221, 59], Cat G [134], Azu [352], LF [61], Lysozym [140], BPI [348], selten PR3 [157] |
| x-ANCA a-ANCA | atypische ANCA | homogen zytoplasmatisch mit Anfärbung der perinukleären Zone | Lysozym [140], BPI [297] |

Tab. 1.1: ANCA Färbemuster in der indirekten Fluoreszenzmikroskopie und deren Zielantigene.

PR3, Proteinase 3; MPO, Myeloperoxidase; NE, Neutrophilen-Elastase; Cat G, Cathepsin G; Azu, Azurozidin; LF, Laktoferrin; BPI, bakterizides Permeabilität steigerndes Protein.

ANCA sind jedoch kein spezifisches Merkmal ANCA-assoziiierter Vaskulitiden. Sie wurden auch bei Patienten mit verschiedenen rheumatischen Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis, systemischem Lupus erythematoses, Sjögrens Syndrom und einigen anderen beschrieben [208]. Zwar besteht bei rheumatischen Autoimmunerkrankungen ein erhöhtes Risiko für Vaskulitis, die Korrelation zu ANCA-Spiegeln wird bislang aber kontrovers diskutiert [61, 143]. Weiterhin wurden ANCA bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen, Autoimmunhepatitis, chemisch induzierten Autoimmunerkrankungen (z. B. Minozyklin-induzierte Arthritis) und Infektionserkrankungen (z. B. Endokarditis) nachgewiesen (Zusammenfassung in [148]). Die stärkste Krankheitsassoziation und höchste Antigenspezifität ist für c-ANCA bei der Wegener'schen Granulomatose beschrieben (Tab. 1.2).

| Erkrankungen | c-ANCA (PR3) [%] | p-ANCA (MPO) [%] |
|--------------------------------|------------------|------------------|
| Wegener'sche Granulomatose | | |
| -Initialphase | 50 | 0 |
| -Generalisation | 95 | <2 |
| Churg-Strauss-Syndrom | 10 | 20-60 |
| Mikroskopische Polyangiitis | 45 | 45 |
| Pauci-immune RPGN ¹ | 25 | 25-65 |

Tab. 1.2: ANCA-Prävalenzen [223, 321, 164].

In den meisten Fällen sind c-ANCA PR3-spezifisch, p-ANCA MPO-spezifisch. In selteneren Fällen wurden andere Spezifitäten beobachtet. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Durchschnittswerte, die in verschiedenen Publikationen z. T. erheblich voneinander abweichen.

¹rapid progressive Glomerulonephritis

1.3 Wegener'sche Granulomatose

Die Wegener'sche Granulomatose ist eine recht seltene Erkrankung über deren Häufigkeit, insbesondere wegen der schwierigen Diagnosestellung, aufgrund der unspezifischen Beschwerden in der Anfangsphase, wenig Angaben existieren. Die Schätzungen schwanken zwischen 0,8 und 3 Fällen pro 100000 in Nordamerika und Europa [329, 63]. Die mittlerweile verbesserten diagnostischen Methoden lassen aber auf eine etwas höhere Inzidenz schließen [51]. Die Erstdiagnose erfolgt häufig bei 40-60 jährigen Patienten, es sind jedoch auch zahlreiche Erkrankungen bei jüngeren Menschen und Jugendlichen beschrieben worden [335, 147]. Männer und Frauen sind von dieser Erkrankung etwa gleich häufig betroffen [147].

Die Wegener'sche Granulomatose verläuft gewöhnlich in zwei Phasen [128]: Zunächst treten im oberen Respirationstrakt granulomatöse Läsionen auf. Innerhalb weniger Wochen, oft auch erst nach Monaten oder Jahren, erfolgt in den meisten Fällen der Übergang zur generalisierten Form, die meist durch Vaskulitis der kleinen Arterien, Kapillaren und Venen gekennzeichnet ist. Die Organbeteiligung ist aber äußerst variabel: bevorzugt manifestiert sich die Erkrankung im Bereich der Nase und den Nebenhöhlen, gefolgt von Lungen und Nieren. Seltener sind Gelenke, Augen, Haut, Nervensystem, Trachea, Herz, Leber und Gastrointestinaltrakt betroffen [99] (Abb. 1.2). Typischerweise tritt segmental nekrotisierende Glomerulonephritis, Vaskulitis und Granulombildung in der Lunge auf (Wegener-Trias).

Hinweise auf die Ätiologie der Erkrankung liefern unter anderem genetische Dispositionen: Träger des Z-Allels von $\alpha 1$ -Antitrypsin ($\alpha 1$ -AT), dem physiologischen Inhibitor von PR3, haben ein statistisch erhöhtes Risiko, das möglicherweise von einem Ungleichgewicht zwischen Protease und Inhibitor verursacht wird [93, 87]. Vermutlich ist auch die offensichtlich genetisch determinierte, konstitutive Expression von PR3 auf der Plasmamembran neutrophiler Granulozyten ein Risikofaktor [344, 116].

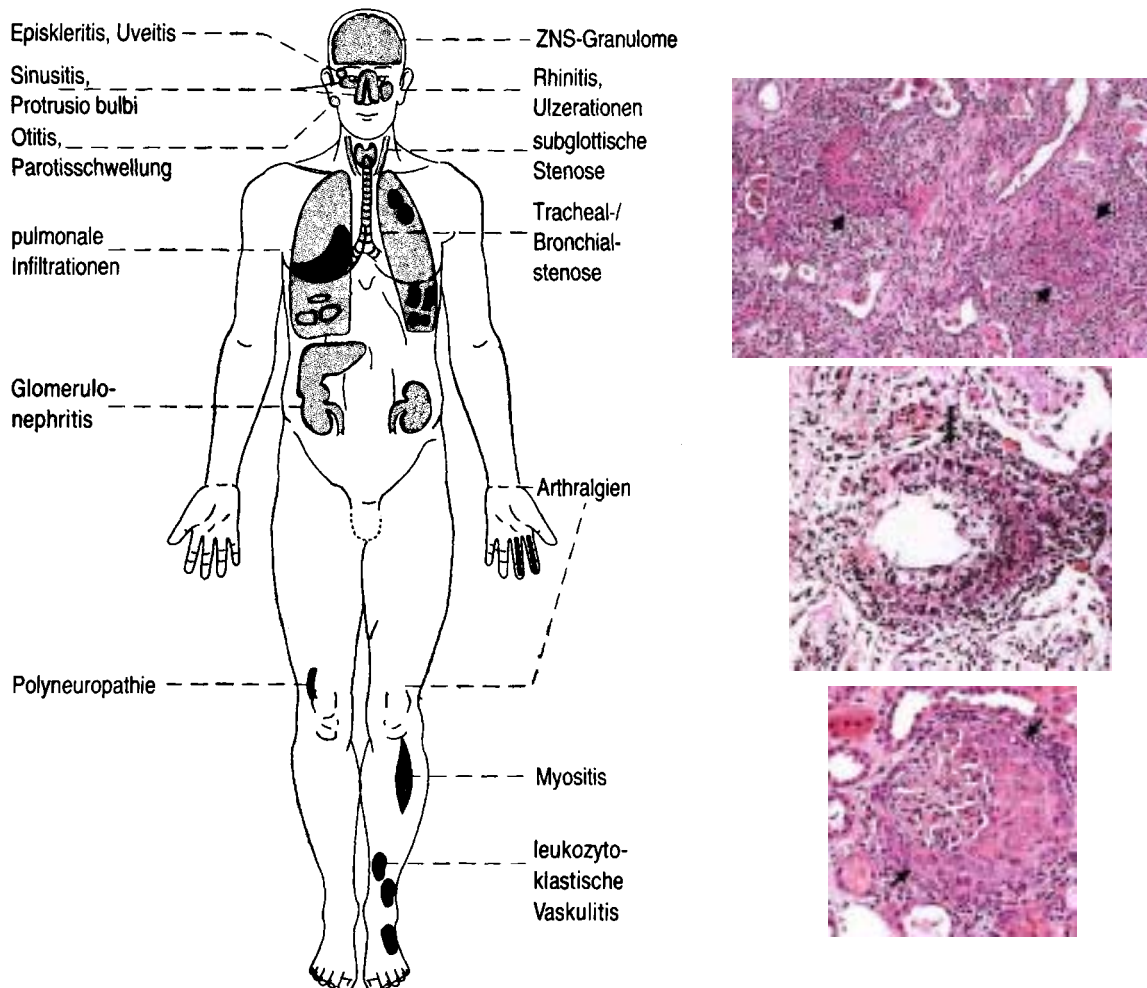


Abb. 1.2: Voll ausgeprägte WG im Generalisationsstadium

WG betrifft am häufigsten den oberen Respirationstrakt, Lunge und Niere. Die klinische Symptomatik kann jedoch äußerst variabel sein.

Rechts: oben: Lungenbiopsie eines WG-Patienten mit Mikroabszessen (Pfeile)

Mitte: Kleines Blutgefäß (Lunge) eines WG-Patienten mit Angiitis

Unten: typische Nierenbiopsie eines WG-Patienten mit segmental nekrotisierender Glomerulonephritis (zwischen den Pfeilen)

Quellen: Abb links aus [125]. Fotos: Martha L. Warnock, M.D, Professor Emerita für Pathologie, University of California, Californien, USA (Internet: <http://pathhsw5m54.ucsf.edu>).

Bis heute liegen keine experimentellen Beweise für das pathogene Potential von c-ANCA *in vivo* vor. Zahlreiche *in vitro* Befunde lassen eine kausale Beziehung zwischen c-ANCA und der Pathogenese von WG aber plausibel erscheinen (Zusammenfassung in [148]). Durch eine immunsuppressive Therapie läßt sich denn auch oft eine dauerhafte Remission erreichen: Eine Kombinationstherapie mit hochdosierten Kortikosteroiden (i. d. R. Prednisolon) und Zytostatika (i. d. R. Cyclophosphamid) führt meist zu einer deutlichen Besserung des klinischen Bildes [147]. Unbehandelt verläuft die Krankheit nach dem Übergang in die generalisierte Phase meist in kurzer Zeit tödlich. Eine medikamentöse Langzeitbehandlung der Patienten ist trotz erheblicher Risiken, wie z. B. infektiöse Komplikationen und Tumorbildung, angezeigt. Die Entwicklung alternativer Therapieformen ist daher wünschenswert.

1.4 c-ANCA in der Wegener'schen Granulomatose

Neben histologischen und radiologischen Befunden ist heute der Nachweis von c-ANCA wichtigster Laborparameter bei der Diagnose einer WG. Die zentrale Frage seit der Entdeckung von c-ANCA bei WG ist aber, ob c-ANCA ein pathogenes Potential besitzen oder ob sie lediglich als Epiphänomen auftreten. WG wie auch mikroskopische Polyangiitis (MPA) und Churg-Strauß-Syndrom (CSS) zählen zu den sog. „pauci-immunen“ Autoimmunvaskulitiden, denn es lassen sich keine oder nur äußerst wenige Immunkomplex- und Komplementablagerungen in den betroffenen Geweben nachweisen. Außerdem gibt es zwar eine enge Korrelation zwischen Krankheitsverlauf und c-ANCA-Serumspiegeln, aber bei ca. der Hälfte der WG-Patienten lassen sich in der lokal begrenzten Anfangsphase keine c-ANCA nachweisen [223]. Dieser negative Befund könnte durch die begrenzte Sensitivität der Nachweismethoden bedingt sein oder darauf hinweisen, daß c-ANCA zu Beginn der Erkrankung keine Rolle spielen. Die Arbeit von Russell und Kollegen belegt, daß PR3-Zymogenspezifische c-ANCA enger mit dem Krankheitsverlauf korreliert sind als c-ANCA-Spiegel, die mit der N-terminal vollständig prozessierten PR3 ermittelt wurden [265]. Eine bessere Kenntnis des Epitopspektrums von c-ANCA dürfte in Zukunft vielleicht zur Entwicklung sensitiverer Nachweismethoden beitragen, die Veränderungen des c-ANCA-Spiegels mit dem Krankheitsverlauf noch besser in Einklang bringen.

Zahlreiche *in vitro* Befunde und klinische Beobachtungen lassen jedoch bereits jetzt die Beteiligung von c-ANCA bei der Entstehung von Vaskulitis bei WG vermuten. Als Krankheitsauslöser werden exogene Stimuli wie Infektionen vermutet. Aber welcher oder welche pathologischen Mechanismen werden durch c-ANCA ausgelöst oder verstärkt?

1. Das Zielantigen PR3 wird in den azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten und Monozyten gespeichert. Erst die Stimulation von Neutrophilen macht das Antigen für die zirkulierenden c-ANCA zugänglich [65, 64]. Neutrophile Granulozyten und deren Aktivierungszustand sind deshalb besonders genau untersucht worden. *In vitro* können neutrophile Granulozyten und Monozyten durch inflammatorische Mediatoren wie TNF α oder IL-8 stimuliert werden, was zur Exposition lysosomaler Granulakomponenten wie PR3 auf der Plasmamembran führt [64]. Ob PR3 an spezifische Oberflächenrezeptoren oder aufgrund seines kationischen Charakters (pI \approx 9) an die negativ geladene Zellmembran bindet, ist bislang ungeklärt [46, 49, 183]. PR3-spezifische ANCA können an das oberflächenexponierte Antigen binden und durch Vernetzung von noch nicht identifizierten PR3-Rezeptoren (möglicherweise ein Mitglied der β_2 -Integrin-Familie) oder F $_c$ -Rezeptoren eine vollständige Aktivierung mit Degranulation und „oxidativem Burst“ hervorrufen [96, 240, 177]. Die Freisetzung von PR3, NE und anderen Enzymen und die Generierung zytotoxischer Sauerstoffintermediate führt schließlich zur Gewebeschädigung (Abb. 1.3).

Das pathogene Potential von c-ANCA wird wohl zusätzlich noch durch die vermehrte Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren verstärkt, die durch die Wechselwirkung der c-ANCA mit Granulozyten und Endothelzellen direkt oder indirekt hervorgerufen wird:

c-ANCA-vermittelte Aktivierung von Neutrophilen führt zur Freisetzung inflammatorischer Mediatoren wie TNF α , IL-1, LTB $_4$ [40, 124].

2. c-ANCA-vermittelte Aktivierung von Monozyten führt zur Freisetzung von IL-8 [243].
3. Apoptotische neutrophile Granulozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche ebenfalls das c-ANCA-Antigen [118]. PR3-ANCA-opsonisierte apoptotische Neutrophile werden von Makrophagen verstärkt phagozytiert, die dabei weitere proinflammatorische Mediatoren, vor allem TNF α , freisetzen [213].
4. c-ANCA interferieren mit der Serinprotease-Serpin-Komplexbildung, was zu einem erhöhten Spiegel zirkulierender, aktiver PR3 führt [83, 144].
5. PR3 kann die Freisetzung von IL-8 aus Endothelzellen induzieren [23].

Tatsächlich findet man bei WG-Patienten erhöhte Spiegel verschiedener Zytokine [169]. Bei der Pathogenese von WG spielen offensichtlich komplexe, positive Rückkopplungseffekte eine wichtige Rolle. PR3 fungiert in der WG also nicht nur als Autoantigen, sondern könnte auch durch seine proinflammatorischen Eigenschaften selbst lokale Entzündungsreaktionen verstärken (zur proinflammatorischen Wirkung von PR3 siehe Kap. 1.5). Auch die durch c-ANCA hervorgerufene Störung der Serinprotease-Serpin-Komplexbildung und die damit verbundene höhere Serum-PR3-

Aktivität könnte zu lokaler und systemischer Inflammation beitragen [144] als auch direkt durch ihre enzymatische Aktivität zu Läsionen führen [8]. Die Inhibition enzymatischer Aktivität durch c-ANCA wurde ebenfalls beschrieben (=antiinflammatorisch?, s. auch folgendes Kapitel) [73]. Inwieweit diese Faktoren pathophysiologisch eine Rolle spielen, ist jedoch noch völlig offen. Die Ursache zur Entstehung von Granulomen bei WG ist ebenfalls noch ungeklärt, aber es werden hier Th1-Zellen zumindest mitverantwortlich gemacht [196, 67].

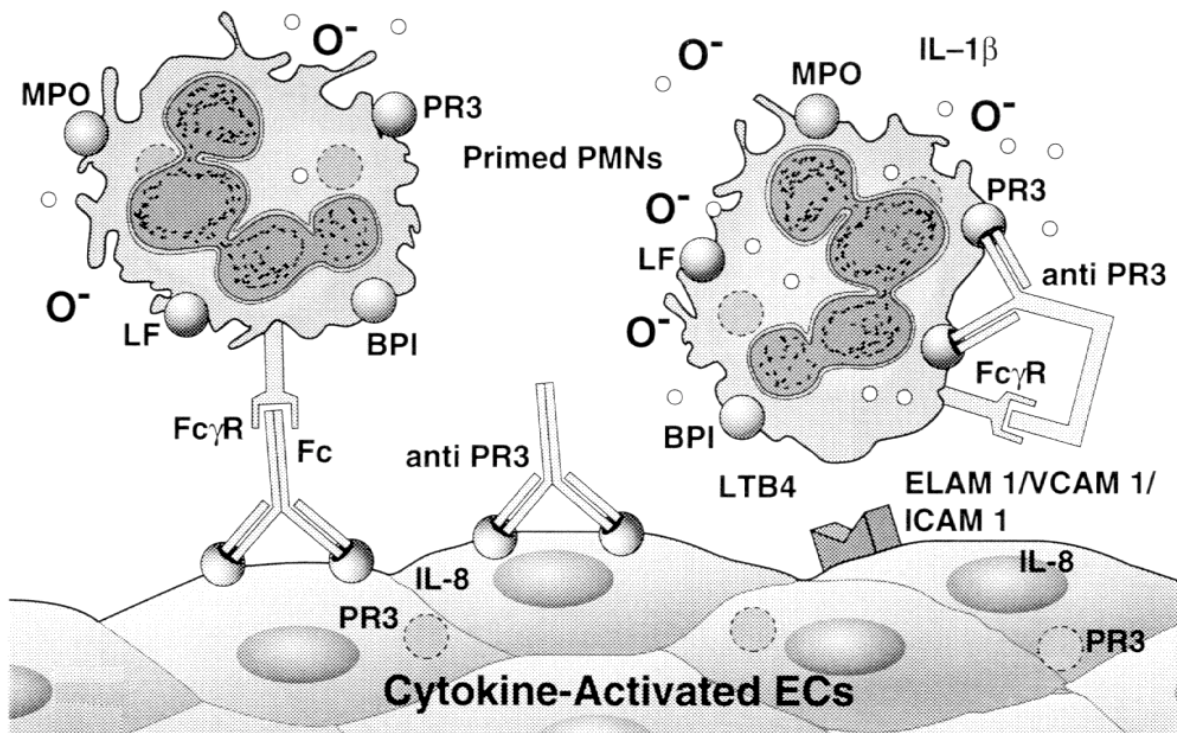


Abb. 1.3: Hypothetisches Modell für die c-ANCA-vermittelte Endothelschädigung.

Neutrophile (*primed PMNs*) und Endothelzellen (*Cytokine-activated ECs*) werden durch eine primäre Infektion und damit verbundener Freisetzung inflammatorischer Mediatoren stimuliert. Die Stimulation führt zu verstärkter Oberflächenexpression von Zelladhäsionsmolekülen und der Translokation von Granulakomponenten auf die Zelloberfläche von Neutrophilen. C-ANCA induzieren schließlich die Aktivierung von Neutrophilen, was zur Freisetzung reaktiver Sauerstoffverbindungen und lytischer Enzyme führt, die das Endothel schädigen. Weitere Erläuterungen im Text. PMN, polymorphonukleäre Zelle; BPI, bakterizides Permeabilität steigerndes Protein; LTB₄, Leukotrien B₄; ELAM 1, *endothelial leukocyte adhesion molecule 1*; VCAM 1, *vascular adhesion molecule 1*; ICAM 1, *intercellular adhesion molecule 1*; LF, Laktoferrin; MPO, Myeloperoxidase. Aus [148].

Die Interaktion von Neutrophilen mit dem Endothel dürfte bei der Schädigung der Gefäße eine wichtige Rolle spielen. Die Aktivierung des Endothels ist dafür Voraussetzung:

1. In einigen Studien konnte gezeigt werden, daß sog. AECA (*anti-endothelial cell antibodies*), die bei verschiedenen Vaskulitiden nachweisbar sind und gegen unterschiedliche Oberflächenantigene des Endothels gerichtet sind, an kultivierte Endothelzellen binden und sie daraufhin aktivieren. Dies führt zu verstärkter Oberflächenexpression von Zelladhäsionsmolekülen und Sekretion von verschiedenen Zytokinen und chemotaktischen Faktoren [70, 77]. Ob dieser Mechanismus eine pathologisch relevante Rolle bei WG spielt, ist jedoch bisher wenig untersucht [273].
2. Inkubation von kultivierten Endothelzellen mit TNF α und IL-1 führt zur verstärkten Bindung von PR3-Autoantikörpern und damit zur weiteren Amplifizierung der Endothelzellaktivierung [204, 205, 36, 159, 282]. Ob Endothelzellen unter speziellen pathologischen Bedingungen PR3 selbst exprimieren oder ausschließlich lokal von Neutrophilen freigesetzte PR3 binden, wird bislang kontrovers diskutiert [203, 172, 230, 282, 308].

1.5 Wegener's Autoantigen: Proteinase 3

Humane Proteinase 3 ist auf dem Chromosom 19 (19p13.3) tandemartig zusammen mit NE und AZU in der selben transkriptionellen Orientierung lokalisiert [353]. Alle 3 Gene besitzen 5 Exons und gehören zu der Klasse 6 der Trypsin-Familie (Zusammenfassung in [152]). Das Maus-Homolog mPR3 ist auf Chromosom 10 zusammen mit NE angeordnet, murines AZU scheint aber nicht zu existieren [21]. 3 Polymorphismen in der kodierenden Region des PR3-Gens sind beim Menschen beschrieben (Val119-Ile, Ala125-Thr, Thr126-Ser, Chymotrypsinogennumerierung [31, 47, 301]), die aber offensichtlich nicht mit WG assoziiert sind [116]. Gencik und Mitarbeiter vermuten aber, daß durch einen krankheitsassoziierten Alanin/Guanin-Polymorphismus im PR3-Promotorbereich eine neue Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Sp1 entstehen könnte, der die Überexpression von PR3 auf der Membranoberfläche von Neutrophilen erklären würde [116]. Diese wurde von Witko-Sarsat gehäuft bei WG-Patienten beobachtet [344].

In der frühen Phase der Differenzierung myeloider Zellen fungiert PR3 als Wachstumsfaktor für hämatopoietische Vorläuferzellen [197]. Im myelomonozytären und Myeloblastenstadium wird der Hauptanteil an PR3 synthetisiert. Im Promyelozytenstadium erfolgt schließlich eine Niederregulierung der PR3-Transkription, die eine Differenzierung zu Myelozyten bewirkt [31]. Es konnte gezeigt werden, daß PR3 im Promyelozytenstadium NF- κ B und den Transkriptionsfaktor Sp1 schneiden kann und das 28 kDa-Hitzeschockprotein, ein möglicher Bestandteil von Signaltransduktionskaskaden, abbaut [104, 291, 249]. Während der PR3-Biosynthese in dieser Phase werden außerdem geringe Mengen des Zymogens freigesetzt, das wiederum das Wachstum hämatopoietischer Vorläuferzellen

beeinflusst [283]. PR3 besitzt darüber hinaus ein äußerst pleiotropes Wirkungsspektrum und übt wichtige regulatorische Funktionen bei inflammatorischen Reaktionen aus (Tab. 1.3).

| | |
|---|--|
| Synonyme [132] | p29 Myeloblastin AGP7 Wegeners Autoantigen |
| Biochemische Eigenschaften | neutrale Serinprotease MW: ca. 29 kDa IEP ¹ : 9,1 228 AS, 54% Homologie mit NE |
| Funktionelle Eigenschaften allgemein | bakterizid, aktivitätsunabhängig gegen gram negative Bakterien [108, 47] Degradation extrazellulärer Matrixproteine* und Basalmembranproteine*: Elastin [168,48], Fibrinogen, Proteoglykane[226], Fibronectin, Laminin, Vitronectin, Kollagen IV [246], außerdem Casein und Hämoglobin [47] Modulation der Aktivität von Blutplättchen* und Endothelzellen* [254, 255] Spaltung des Thrombin-Rezeptors [255] induziert Emphyseme beim Hamster [168] Einfluß auf die Aktivierung von Neutrophilen* [185, 184] Myeloidzellendifferenzierung [31], CML ² -assoziiertes Antigen bei der GVL ³ -Reaktion [212] |
| funktionelle Modulation inflammatorischer Mediatoren und deren Rezeptoren | Inaktivierung von C1-Inhibitor [192], Aktivierung von membrangebundenem pro-TNFα* [259, 58], Aktivierung von latentem TGFβ* [66], IL-1β* [58] und IL-18 [98]. Inaktivierung von IL-6* [12], Konvertierung von IL-8* [229], Spaltung des IL-2-Rezeptors* und des IL-6-Rezeptors* [13] |
| Einfluß auf Endothelzellen | induziert Zytolyse* [8] und Apoptose* [347] verstärkt IL-8-Synthese* [23] |

Tab. 1.3: PR3 besitzt ein äußerst pleiotropes biologisches Wirkungsspektrum, das teilweise mit dem von NE überlappt*.

¹ isoelektrischer Punkt, ² chronisch myeloische Leukämie, ³ *graft versus leukemia*

PR3 wird als Präproenzym mit N-terminalem Signal- und Propeptid synthetisiert. Bei der Translokation in das endoplasmatische Retikulum wird das Signalpeptid abgespalten. Anschließend wird das Proenzym an zwei Positionen mit Mannose-Oligosacchariden glykosyliert, die im Golgi-Apparat in komplexe Saccharidketten mit terminalen Sialinsäureresten konvertiert werden. Schließlich wird das Propeptid Ala-Glu von einer noch unbekanntem Cystein-Protease abgespalten. Zuletzt erfolgt eine C-terminale Prozessierung durch eine Trypsin-ähnliche Protease oder Carboxypeptidase, die die letzten 7 Aminosäuren abspaltet. Der Hauptanteil des synthetisierten Proteins wird in den azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten und Monozyten gespeichert [248, 112]. Der niedrige pH-Wert und die Komplexbildung mit der Proteoglykan-Matrix hält das Enzym dabei in einem inaktiven Zustand, der bei der Translokation in ein neutrales Milieu aufgehoben wird [7, 179]. Geringe Mengen PR3 wurden auch in den sekundären Granula und sekretorischen Vesikeln nachgewiesen [130, 342]. Weiterhin wird PR3 auch konstitutiv auf der Plasmamembran neutrophiler Granulozyten exprimiert [344].

Proteinase 3 gehört zur Familie der Trypsin-ähnlichen neutralen Serinproteasen. Der Name dieser Familie leitet sich aus der hochkonservierten Struktur des katalytischen Zentrums ab, dessen sog. katalytische Triade sich aus Histidin, Aspartat und Serin zusammensetzt. Nach Bindung des Substrats über die Substratbindungsstellen greift die γ -Hydroxylgruppe des Ser-195 nukleophil das Carbonylatom der Peptidbindung des Substrats an. Dieser Prozeß wird durch die Übertragung eines Protons auf den Imidazolring des His-57 ermöglicht. Aspartat-102 neutralisiert dabei die positive Ladung am Histidin. Das tetraedrische Zwischenprodukt wird durch Wasserstoffbrücken mit Gly-193 und Ser-195 stabilisiert. Der Carboxyteil erhält daraufhin das Proton vom Imidazolring zurück und wird freigesetzt. Das resultierende Acylintermediat wird nach dem der Acylbildung analogen Mechanismus hydrolysiert (Zusammenfassung in [180]).

NE und PR3 liegen als monomere Proteine mit 4 Disulfidbrücken vor. Die Aktivierung des Zymogens folgt einem für Serinproteasen typischen Mechanismus, bei dem durch die Abspaltung des Propeptids ein Konformationswechsel induziert wird. Der neue N-Terminus Isoleucin geht dabei eine ionische Wechselwirkung mit Asp-194 (Chymotrypsinogennumerierung) ein, der die Orientierung von Lys-145 verändert und die Ausbildung einer spezifischen Substratbindetasche ermöglicht (Zusammenfassung in [298]). Die Spezifität von PR3 wird durch die Reste Gly-189, Ile-190, Phe-192, Asp-213, Val-216 und Asp-226 bestimmt [29, 44]. Proteinase 3 der Maus dürfte ein ähnliches oder gleiches Substratspektrum besitzen, da neben der allgemeinen hohen Homologie (69% identische Aminosäuren) die angeführten Reste identisch zur humanen PR3 sind [6]. Die Substitutionen Val-190 durch Ile und Ala-213 durch Asp engen die S1-Tasche im Vergleich zu NE ein [107]. Dies erklärt die Präferenz für

kleine aliphatische Aminosäuren wie Alanin, Serin oder Valin an P1-Position [246, 44, 166]. Die spezifischsten synthetischen Peptidsubstrate für NE und PR3 sind Tetrapeptidderivate mit der Sequenz Ala-Ala-Pro-Val-wie z. B. Methoxysuccinyl-alanyl-alanyl-prolyl-valyl-paranitroanilid. Das Prolin in der P₂-Position beschränkt die Spezifität des Substrats auf Serinproteasen [312, 313]. Aufgrund des restriktiveren S1-Rests von PR3 im Vergleich zu NE sind PR3-spezifische synthetische Substrate, die nicht von NE hydrolysiert werden, in der Literatur bislang nicht dokumentiert [166].

Da NE größere Seitenketten wie Ile oder Leu an der P1-Stelle toleriert, überlappt das Substrat- und Inhibitorspektrum der NE nicht vollständig mit dem der PR3. Der physiologisch wichtigste Inhibitor für beide humanen Proteasen ist das Serpin (*serine protease inhibitor*) α 1-Antitrypsin (α 1-AT oder α 1-PI, α 1-Proteinaseinhibitor) [246]. Die Spezifität beruht auf der Ähnlichkeit der Primärstruktur der *reactive site loop* mit proteasespezifischen Substraten (α 1-AT-Sequenz von P4 nach P4': AIPM \uparrow SIPP) (Zusammenfassung in [269]). Wird das Gleichgewicht Serpin-Serinprotease gestört, führt unkontrollierte Proteolyse zu Gewebeschäden, wie sie zum Beispiel beim Lungenemphysem auftreten [168]. Dieses Ungleichgewicht kann durch die Degradation des Inhibitors durch Proteasen aus neutrophilen Granulozyten wie NE und Metalloproteasen hervorgerufen werden [325, 1]. Die Oxidation des Methionin an der P1-Stelle z. B. durch Zigarettenrauch führt zu einem erhöhten Risiko für Lungenemphysem [50]. Verminderte α 1-AT-Spiegel können auch genetische Ursachen haben. So haben Träger des Z-Allels des α 1-AT-Gens, das zu α 1-AT-Mangel führt, ein erhöhtes Risiko, an Lungenemphysem, aber auch an Wegener'scher Granulomatose zu erkranken [93, 87]. Unter normalen Bedingungen liegt ein deutlicher Überschuss an zirkulierenden Proteaseinhibitoren vor, so daß die zirkulierenden Serinproteasen mit einem Inhibitor komplexiert sind.

Weitere Inhibitoren von PR3 und NE sind Elafin, ein Inhibitor der vor allem in der Haut gefunden wird und α 2-Makroglobulin [246, 337]. Sehr unterschiedliche inhibitorische Wirkung auf die beiden Serinproteasen üben Eglin C und SLPI (*secretory leukocyte protease inhibitor*) aus: Im Gegensatz zu NE wird PR3 von Eglin C nur schwach inhibiert. SLPI ist dagegen der einzige bekannte Inhibitor, der zwischen NE (starke Inhibition) und PR3 (keine Inhibition) vollständig diskriminiert [246].

1.6 Gewinnung funktioneller, rekombinanter Proteine aus *E. coli*

Die Erforschung biologischer Funktionen und des pathogenen Potentials von PR3 wurde bisher durch die Verfügbarkeit des Enzyms limitiert. Die Gewinnung humaner PR3 aus neutrophilen Granulozyten ist aufwendig und teuer. Die Herstellung muriner PR3 gestaltet sich aufgrund des geringen Blutvolumens und des geringeren Anteils von Granulozyten in der Leukozytenpopulation der Maus ungleich schwieriger (Mensch: ca. 60%, Maus: ca. 10-20%, Kap. 4.1.1). Zahlreiche Publikationen

beschreiben verschiedene Expressionssysteme, mit denen diese Probleme behoben werden sollen. Das rekombinante Material war aber entweder aufgrund seiner inkorrekten Faltung oder geringer Ausbeuten nur bedingt einsetzbar (Kap. 5.4). Die rekombinante Expression in Prokaryoten wie *E. coli* ist wegen hoher Expressionsraten und geringer Kosten im industriellen Maßstab einsetzbar. Die zytosolische Synthese heterolog überexprimierter Proteine wird aber vor allem durch das Fehlen posttranslationaler Modifikationen und Chaperon-vermittelter Faltung sowie dem reduzierenden Milieu, das die korrekte Ausbildung von Disulfidbrücken verhindert, erschwert. Heterologe, überexprimierte Proteine mit Disulfidbrücken liegen deshalb als unlösliche Proteinaggregate, sog. Einschußkörperchen, vor (Zusammenfassung in [263]).

Das rekombinante Material muß deshalb solubilisiert und anschließend in die korrekte dreidimensionale Struktur überführt werden (Abb. 1.4). Hierzu werden die Einschußkörperchen in hochmolaren, chaotropen Salzlösungen wie Guanidiniumchlorid denaturiert. Intermolekulare Disulfidbrücken werden durch ein zugesetztes Reduktionsmittel reduziert. Durch rasche Verdünnung des Proteinsolubilisats wird dann der Rückfaltungsprozeß eingeleitet. Ein kritischer Parameter bei diesem Prozeß ist die Proteinkonzentration: je niedriger die Konzentration, desto stärker wird das Reaktionsgleichgewicht Richtung monomolekularer Faltung verschoben. Für die Ausbildung der korrekten Disulfidbrücken hat sich bei Serinproteasen die Methode der Oxidation zu gemischten Disulfiden bewährt [338]: Zunächst werden die SH-Gruppen des denaturierten Polypeptids mit einem Überschuß einer oxidierten Thiolkomponente (Gluthation, GSSG) modifiziert. Im anschließenden Renaturierungsschritt wird die Ausbildung der Disulfidbrücken durch Zugabe einer reduzierten Thiolkomponente katalysiert. Die korrekte Kombination der acht Cysteinreste wird durch die minimale freie Energie begünstigt (Zusammenfassung in [262, 194]).

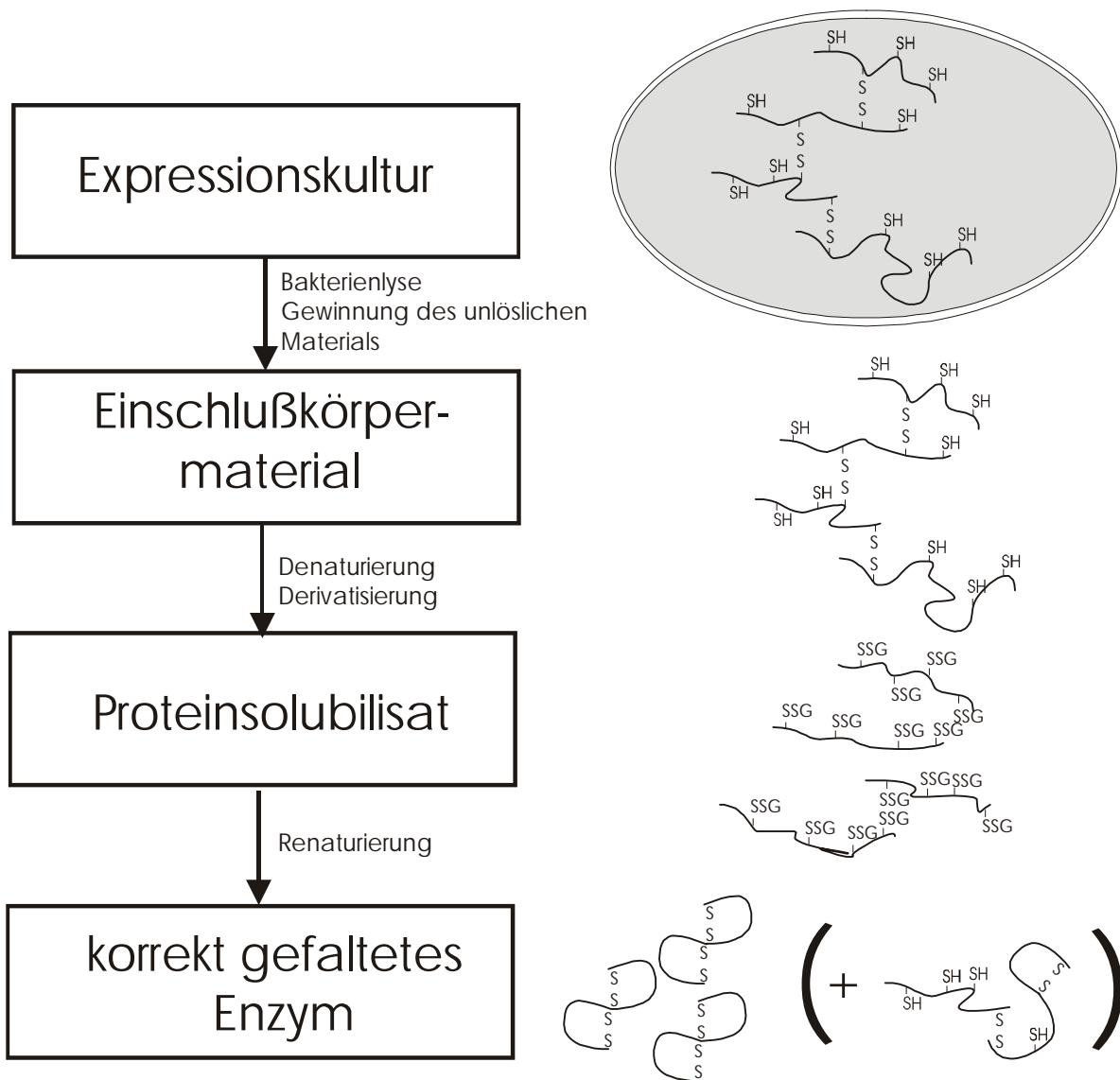


Abb. 1.4: Schematische Übersicht zur Vorgehensweise der Gewinnung enzymatisch aktiven Materials aus *E. coli*.

Erster Schritt: rekombinante Expression in *E. coli* als Einschlußkörpermaterial. Das überexprimierte Protein liegt als aggregierte Polypeptidketten unter teilweiser Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken im Zytosol vor (oben rechts).

Zweiter Schritt: das Einschlußkörpermaterial wird nach Bakterienlyse und Zentrifugation als unlösliches Material isoliert (rechts, zweiter Schritt von oben).

Dritter Schritt: die Proteinaggregate werden solubilisiert, Cysteinreste durch oxidiertes Glutathion (GSSG) derivatisiert (rechts, dritter Schritt von oben).

Vierter Schritt: Durch Ansäuern werden die gemischten Disulfide stabilisiert und anschließend das Redoxsystem durch Dialyse entfernt. Rasche Verdünnung induziert die Faltung des Enzyms. Der Anteil aggregierter, nicht korrekt gefalteter Polypeptidketten ist bei größerer Verdünnung geringer, da Prozesse erster Ordnung über Aggregationsprozesse höherer Ordnung dominieren (unten rechts). Die Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken wird durch eine reduzierte Thiolkomponente wie reduziertem Glutathion (GSH) oder Cystein katalysiert.

1.7 Die Arthus-Reaktion

Die sog. Arthus-Reaktion gehört zu den Immunkomplex-vermittelten Hypersensitivitätsreaktionen vom Typ III nach Gell und Coombs. Grundsätzlich ermöglichen Antigen-Antikörper-Komplexe die Beseitigung eines Antigens durch Phagozyten. Sehr große Mengen von Immunkomplexen können aber zur Gewebeschädigung führen.

Man unterscheidet die lokale Arthus-Reaktion, wenn Immunkomplexe im Gewebe lokal begrenzt abgelagert wurden, und die generalisierte Form, wenn große Mengen des Antigens in den Blutkreislauf gelangen und mit zirkulierenden Antikörpern Immunkomplexe bilden. Der überwiegende Teil der Gewebeschädigung wird durch reaktive Sauerstoffintermediate und lytische Enzyme aus aktivierten Neutrophilen hervorgerufen, die die Immunkomplexe zu phagozytieren versuchen. Ein klassisches Beispiel einer generalisierten Typ III-Reaktion ist die sog. „Serumkrankheit“: Bei Verabreichung von xenogenen Antitoxinseren (z. B. Anti-Tetanus) bildet der Empfänger Antikörper gegen Proteine aus dem Fremdserum; diese Antikörper bilden bei erneuter Serumbgabe zirkulierende Immunkomplexe mit dem fremden Serumantigen aus [82]. Symptomatisch äußert sich die Serumkrankheit meist mit Fieber, Ödemen und einer generalisierten Vaskulitis.

Experimentell wurde eine lokale Typ III-Reaktion als erstes von Arthus beschrieben, der hyperimmunisierten Tieren intradermal das entsprechende Antigen injizierte [4]. Sie ist gekennzeichnet durch Ödembildung, Neutrophilie, Hämorrhagie und schließlich Gewebenekrose. Zum Zwecke präziserer, quantitativer Auswertung einer experimentell induzierten TypIII-Reaktion wird heute die reverse passive Arthus-Reaktion bevorzugt, denn sie ist nicht vom Erfolg der Immunisierung abhängig. In der reversen passiven Arthus-Reaktion (RPA) wird lokal ein Überschuß an Antikörpern vorgelegt und das entsprechende Antigen intravenös verabreicht. Diese Vorgehensweise gewährleistet im Hautmodell perivaskuläre Deposition von Immunkomplexen in der Dermis und löst eine rasche inflammatorische Antwort aus. Welche Faktoren die inflammatorische Kaskade auslösen und welche Zellen beteiligt sind, ist jedoch bis heute ungeklärt. Neuere Arbeiten legen nahe, daß die Arthus-Reaktion nicht, wie bislang angenommen, durch eine einheitliche Reaktionskaskade definiert ist. Vielmehr scheint die Beteiligung humoraler Faktoren wie Komplement und TNF α und verschiedener Zelltypen wie Makrophagen und Mastzellen sowohl vom Ort der Immunkomplexablagerung (Haut, Lunge, Peritonealhöhle) als auch von der untersuchten Spezies abzuhängen [351, 244, 304, 305, 142]. Im Hinblick auf die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten, wird dieser Aspekt erst in Kap. 5.2 ausführlich diskutiert.

1.8 Zielsetzung

Die Erforschung des pathogenen Potentials von c-ANCA wird im wesentlichen durch zwei Faktoren limitiert:

1. Verfügbarkeit des Antigens: Kommerziell erhältliche humane PR3 wird aus großen Mengen Blut und in sehr aufwendigen und ineffizienten Arbeitsschritten gewonnen. Weiterhin können Kontaminationen mit verschiedenen Antigenen nie ganz ausgeschlossen werden [168, 192]. In der Literatur sind verschiedene Expressionssysteme beschrieben, mit denen diese Probleme behoben werden sollen. Das rekombinante Material war aber entweder aufgrund seiner inkorrekten Faltung oder geringer Ausbeuten nur bedingt einsetzbar (Kap. 5.4). Da c-ANCA an Konformationsepitope von PR3 binden, ist eine korrekte Sekundär- und Tertiärstruktur von entscheidender Bedeutung [25].
2. Fehlende Kreuzreaktivität humaner c-ANCA mit muriner PR3: Um das pathogene Potential von c-ANCA zu beweisen, sind Experimente am Tiermodell erforderlich. Sie waren bisher nicht möglich, denn humane c-ANCA kreuzreagieren nicht mit dem Maus-Homolog [153].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte deshalb eine Methode etabliert werden, mit der sich katalytisch aktive, d. h. korrekt gefaltete, murine PR3 herstellen läßt. In Kombination mit den zu Arbeitsbeginn zur Verfügung gestellten PR3/NE-defizienten Mäusen sollten murine c-ANCA hergestellt werden und deren pathogenes Potential an WT-Mäusen dargestellt werden. Ferner sollte die Beteiligung der beiden Serinproteasen PR3 und NE an entzündlichen Reaktionen am Tiermodell untersucht werden. Die Ergebnisse des Tiermodells sollten außerdem durch die biochemische Charakterisierung des rekombinanten Materials ergänzt werden.

2 Material

2.1 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen Amersham-Pharmacia, New England Biolabs, GibcoBRL, Dianova, Difco, Fluka, Merck, MWG Biotech, Novagen, Promega, Qiagen, Roth, Serva und Sigma bezogen. Weitere Bezugsquellen sind im einzelnen in der Methodenbeschreibung aufgeführt.

2.2 Geräte

| | |
|----------------------------------|---|
| Autoklav | Varioklav (H+P Labortechnik) |
| Begasungsschrank | BBD6220 (Heraeus) |
| Brutschrank | Jouan |
| Computer | |
| Hardware | Macintosh Quadra 700 (Apple) ThinSTAR Terminal (NCD) Pentium PC (verschiedene) Windows NT 4.0 (Microsoft) Windows CE (Microsoft) Word (Microsoft) Excel (Microsoft) Draw (Corel) |
| Software | Oligo (National Biosciences) GCG-Package 9 (Wisconsin) |
| Elektrophoresekammern/Netzgeräte | Bio-Rad, Amersham-Pharmacia, institutseigene Werkstatt |
| Elektrotransformationsanlage | Bio-Rad |
| <i>ELISA-Reader</i> | MR 4000 (Dynatech) |
| FACS | FACScan, FACSCalibur (Becton-Dickinson) |
| Filme | Hyperfilm ECL (Amersham-Pharmacia) |
| Filmentwickler | X-Omat M35 (Kodak) |
| FPLC | Amersham-Pharmacia, Econo-System (Bio-Rad) |
| Geldokumentationsanlage | Image Master VDS (Amersham-Pharmacia) |
| Heizblöcke | Thermomixer 5436 (Eppendorf) |
| Homogenisator | RZR1 (Heidolph) |
| Kühlinkubator | Frigomix U2 (Braun) |
| Lyophilisator | LYOVAC GT 2 (Leybold) |
| Magnetrührer | MR3003 (Heidolph) |
| Mikroskop | Axioplan (Zeiss) |
| Mikrowellenofen | Micromat (AEG) |
| PCR-Thermocycler | Trio-Thermobloc (Biometra) |
| pH-Meßgerät | pH 537 (WTW) |
| Schüttelinkubatoren | HT (Infors) |
| Spektrophotometer | Gene Quant II (Amersham-Pharmacia), UV-160A (Shimadzu) |
| Sterilbank | LaminAir HB 2472S (Heraeus) |

| | |
|-----------------------|---|
| Taumler, Schüttler | Fröbel, Heidolph |
| Ultraschallgenerator | Sonifier 450 (Branson) |
| Ultrafiltrationsgerät | ProVario (Pall-Gelman) |
| Waagen | Sartorius, PM 4800 Delta Range, PJ 300 (Mettler) |
| Wasserbadinkubator | MA6 (Lauda) |
| Zentrifugen | 5417, 5415C (Eppendorf), RC-5A, RC-5B, RC-5C, RC-3B (Sorvall), Biofuge pico, Varifuge 3.0R, Minifuge T (Heraeus), L8-50 M/E (Beckman) |

2.3 Bakterienstämme

| <u>Stamm</u> | <u>Genotyp</u> |
|----------------|---|
| DH5 α | F ⁻ , Φ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺), <i>supE44</i> , λ^- , <i>tfi-1</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA1</i> |
| BL21(DE3) | F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (DE3) |
| B834 (DE3) | F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>met</i> (DE3) |
| BLR (DE3)pLysS | F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻), (DE3) <i>gal</i> , <i>dcm</i> , Δ (<i>srl-recA</i>)306::Tn10(tet ^R)pLysS(cam ^R) |
| HMS174(DE3) | F ⁻ , <i>recA</i> , <i>hsdR</i> (rK12 ⁻ mK12 ⁺), Rif ^R (DE3) |

2.4 Mausstämme

Versuchstiere wurden unter konventionellen Bedingungen im institutseigenen Tierhaus gehalten. Für experimentelle Arbeiten wurde der Inzuchtstamm 129/SV/EV verwendet. Kongene PR3/NE-defiziente Mäuse wurden von Dr. Leopold Fröhlich zur Verfügung gestellt [105].

2.5 Rekombinante Plasmide und Vektoren

| <u>Plasmid (Herkunft)</u> | <u>Beschreibung</u> |
|---|--|
| pET24cHST (Daniel Pilat, Dissertation 1996) | pET24c(+)-Derivat mit (His) ₈ -Strep-tag in der MCS |
| pcDNA3.1/PR3/6a (Heike Reimann) | <i>mPR3</i> cDNA aus Knochenmark in pcDNA3.1 |
| pHK ME/WT (Elke Wilharm, Dissertation 1999) | pET24c-Derivat, <i>hproGzmK</i> mit N-terminalem Propeptid ME, WT C-Terminus |
| mPR3 pET24c/3 (diese Arbeit) | pET24c-Derivat, <i>mPR3</i> mit N-terminalem Propeptid ME (<i>promPR3</i>) |
| mPR3 pET24c/i2 (diese Arbeit) | wie mPR3pET24c/3 mit einer deletierten Base zwischen Ribosomen-Bindungsstelle des Vektors und Startcodon von <i>pro-mPR3</i> , optimierte Codons bis Alanin ₉ |
| mPR3pET24c/C-S (diese Arbeit) | wie mPR3pET24c/i2 mit Cystein ₄₇ mutiert zu Serin |

| | |
|-------------------------------|---|
| mPR3pET24c/F1 (diese Arbeit) | wie mPR3pET24c/i2, Methionin1 bis Glutamat49 durch homologe Sequenz aus pHK ME/WT ersetzt |
| mPR3pET24c/F2 (diese Arbeit) | wie mPR3pET24c/i2, Tyrosin16 bis Glutamat49 durch homologe Sequenz aus pHK ME/WT ersetzt |
| mPR3pET24c/F3a (diese Arbeit) | wie mPR3pET24c/i2, optimierte Codons bis Prolin15 |
| mPR3pET24c/F3b (diese Arbeit) | wie mPR3pET24c/i2, Methionin1 bis Tyrosin16 durch homologe Sequenz aus pHK ME/WT ersetzt |
| mPR3pET24c/F4 (diese Arbeit) | wie mPR3pET24c/F3a, N-Terminus: M-E-I-V-G-G-K-E-V-S-P-H |
| mPR3pET24c/F5a (diese Arbeit) | wie mPR3pET24c/F3a, N-Terminus: M-E-I-V-G-G-H-E-V-S-P-H |
| mPR3pET24c/F5b (diese Arbeit) | wie mPR3pET24c/F3a, N-Terminus: M-E-I-V-G-G-H-E-A-S-P-H |
| mPR3pET24c/F5c (diese Arbeit) | wie mPR3pET24c/F3a, N-Terminus: M-E-I-V-G-G-K-E-A-R-P-H |
| mPR3pET24c/F6a (diese Arbeit) | wie mPR3pET24c/F3a, N-Terminus: M-E-I-V-G-G-H-E-V-R-P-H |
| mPR3pET24c/F6b (diese Arbeit) | wie mPR3pET24c/F3a, N-Terminus: M-E-I-V-G-G-H-E-A-R-P-K |

2.6 Oligonukleotide

| Bezeichnung | Sequenz | Verwendung |
|-------------|---|---|
| DJ168 | 5'-CAC CCA GCA CCA CTG TCACAA G-3' | Rückwärtsprimer für Amplifikation des 5'-Fragments aus mPR3 pET24c/i2 für mPR3 pET24c/F3a und mPR3pET24c/F3b |
| DJ187 | 5'-CCG GCA TAG GAA GGT GAC CA-3' | Rückwärtsprimer für Amplifikation des 5'-Fragments aus mPR3 pET24c/3 für mPR3 pET24c/i2 |
| DJ845 | 5'-GCA GTC CAA TTA ATG GAA ATC GTG GGT GGC CAC GAA GCG CGC CC-3' | Vorwärtsprimer für <i>promPR3</i> aus pcDNA3.1/PR3/6a: Einführung <i>Ase</i> I-Schnittstelle |
| DJ978 | 5'-GGA TAA GGG TAC CTT AGG GCT CT-3' | Rückwärtsprimer für <i>promPR3</i> aus pcDNA3.1/PR3/6a: Einführung <i>Kpn</i> I-Schnittstelle |
| DJ1201 | 5'-GAT ATA CCA TAT GGA AAT CGT GGG CGG C-3' | Vorwärtsprimer für Amplifikation des 5'-Fragments aus mPR3 pET24c/3 für mPR3 pET24c/i2 |
| DJ1360 | 5'-TAC CCA CGC CGA AAC AAG-3' | Vorwärtsprimer für Amplifikation des 5'-Fragments aus mPR3 pET24c/i2 für mPR3pET24c/C-S, mPR3pET24c/F1, mPR3pET24c/F3b und aus mPR3pET24c/F3a für mPR3pET24c/F4, mPR3pET24c/F5a, mPR3pET24c/F5b, mPR3pET24c/F5c, mPR3pET24c/F6a, mPR3pET24c/F6b |

Material

| | | |
|--------|--|--|
| DJ1378 | 5'-GGT AAA CCG CTG CAG GCA GTG GGC T-3' | Rückwärtsprimer für Amplifikation des 5'-Fragments aus pHK ME/WT für mPR3pET24c/F1 und mPR3pET24c/F2 |
| DJ1379 | 5'-GAT GTC CTG CAG GCT GTG G-3' | Rückwärtsprimer für Amplifikation des 5'-Fragments aus mPR3 pET24c/i2 für mPR3pET24c/C-S |
| DJ1400 | 5'-CGA AGC GCG CCC TCA CTC TCG TCC GTA CGT AGC AT-3' | Rückwärtsprimer für Amplifikation des 5'-Fragments aus mPR3 pET24c/i2 für mPR3 pET24c/F3a und mPR3pET24c/F3b |
| DJ1477 | 5'-AAA GAA GCG CGC CCT CAT TCC AGG CCA TAT GTG GCC TCC CTC CAG-3' | Vorwärtsprimer für Amplifikation des 5'-Fragments aus mPR3 pET24c/i2 für mPR3pET24c/F2 |
| DJ1516 | 5'-TAC TGG ATG GAG GCT TTA AAT GGC-3' | Rückwärtsprimer für Amplifikation des 5'-Fragments aus mPR3 pET24c/i2 für mPR3pET24c/F3b |
| DJ1551 | 5'-GTA CGG ACG AGA GTG AGG AGA AAC TTC TTT GCC GCC CAC GAT TTC CA-3' | Rückwärtsprimer für Amplifikation des 5'-Fragments aus mPR3 des pET24c/F3a für mPR3pET24c/F4 |
| DJ1579 | 5'-GTA CGG ACG AGA GTG AGG AGA AAC TTC GTG GCC-3' | Rückwärtsprimer für Amplifikation des 5'-Fragments aus mPR3pET24c/F3a für mPR3pET24c/F5a |
| DJ1580 | 5'-GTA CGG ACG AGA GTG AGG AGA CGC TTC GTG GCC-3' | Rückwärtsprimer für Amplifikation des 5'-Fragments aus mPR3pET24c/3a für mPR3pET24c/F5b |
| DJ1581 | 5'-GTA CGG ACG AGA GTG AGG ACG CGC TTC TTT GCC-3' | Rückwärtsprimer für Amplifikation des 5'-Fragments aus mPR3pET24c/3a für mPR3pET24c/F5c |
| DJ1635 | 5'-GTA CGG ACG AGA GTG AGG ACG AAC TTC-3' | Rückwärtsprimer für Amplifikation des 5'-Fragments aus mPR3pET24c/F3a für mPR3pET24c/F6a |
| DJ1636 | 5'-GTA CGG ACG AGA TTT AGG ACG CGC-3' | Rückwärtsprimer für Amplifikation des 5'-Fragments aus mPR3pET24c/F3a für mPR3pET24c/F6b |

3 Methoden

3.1 Plasmidisolierung aus *E. coli* [26]

Präparationen kleinen Maßstabs (Minipräparationen, max. zwei ml Kulturvolumen) erfolgten durch alkalische Lyse nach Birnboim und Doly [26], jedoch ohne Phenol-Chloroform-Extraktion. Präparationen mittleren und großen Maßstabs (Midi-/Maxipräparationen) wurden mit dem „Plasmid/cosmid purification kit“ und zugehörigem Protokoll der Firma Qiagen durchgeführt.

3.2 DNA-Amplifizierung (PCR)

Zur Klonierung der in dieser Arbeit beschriebenen Konstrukte wurde ausschließlich *Pfu*-Polymerase (Stratagene) oder Elongase (Gibco) mit den vom Hersteller mitgelieferten Puffern verwendet. Alle PCR-Reaktionen wurden mit einem Vorinkubationsschritt gestartet, um unspezifische Primerbindung an die template-DNA und Elongation vor Programmstart zu verhindern (sog. Heißstart, [57]). Hierzu wurde vor dem ersten Denaturierungsschritt das Primergemisch in den auf 85°C vorgewärmten Reaktionsansatz gegeben. Nach einem Denaturierungsschritt (5 Minuten 94°C) folgten sogenannte „touchdown“-Zyklen: Sie erhöhen die Spezifität einer Amplifizierungsreaktion, da in den initialen Zyklen durch allmähliches Annähern an die spezifische Annealing-Temperatur der Primer nur Sequenzen mit größtmöglicher Homologie erkannt werden. Der „touchdown“ wurde 14°C über der in Kap. 3.8 angegebenen Annealing-Temperatur gestartet und für je zwei Zyklen in 2°C-Dekrementschritten durchgeführt. Nach Erreichen der Primer-Annealing-Temperatur folgten 30 Amplifizierungszyklen.

Reaktionsbedingungen (Zyklen):

| | |
|------------------------------|------------------------------------|
| Denaturierung: | 94°C 45s |
| Annealing: | primerspezifisch 45s (Kap. 3.8) |
| Elongation: | 68°C 1min/kb |
| Primerkonzentration (final): | 0,2mM |
| dNTP-Konz. (final): | 0,2mM |
| template-DNA: | 5ng pro 25µl-Ansatz |

3.3 DNA-Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau von Plasmid-DNA erfolgte nach Standardprotokollen [270]. Die Konzentration der eingesetzten Restriktionsenzyme wurde aus der spezifischen Aktivität des Enzyms (1U entspricht der Enzymmenge, die in einer Stunde unter optimalen Reaktionsbedingungen 1 µg λ-DNA schneidet) unter Verwendung der vom Hersteller mitgelieferten Puffer errechnet. In der Regel

wurde je nach Stabilität und unspezifischer Aktivität („star activity“) des jeweiligen Enzyms das zwei- bis fünffache der errechneten Menge eingesetzt. Die Endkonzentration des Enzyms betrug wegen der inhibitorischen Wirkung des im Enzymlagerpuffers verwendeten Glycerins nicht mehr als 1/10 des Reaktionsvolumens. Bei Doppelrestriktionsverdau wurde, sofern kein Konsensuspuffer laut Herstellerangaben verwendet werden konnte, zunächst mit dem unter niedrigeren Ionenbedingungen schneidenden Enzym verdaut; vor Zugabe des zweiten Enzyms wurde der Reaktionsansatz auf die optimalen Ionenbedingungen aufgepuffert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Auftragspuffer für die Agarose-Gelelektrophorese oder durch thermische Inaktivierung der Enzyme gestoppt. Die optimale Enzymkonzentration und Inkubationszeit für einen Partialverdau wurde zunächst im analytischen Maßstab empirisch ermittelt und anschließend auf den präparativen Maßstab übertragen.

3.4 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA nach Molekulargewicht erfolgte in horizontalen Agarosegelen unter Verwendung von TBE und Ethidiumbromid nach einem Standardprotokoll [270]. Die Größenbestimmung wurde unter UV-Licht anhand eines Molekulargewichtsstandards (λ HindIII, Φ X-174-HaeIII und λ HindIII/EcoRI; Amersham-Pharmacia, Geneo Bioproducts) durchgeführt.

| | | |
|--------------------|-----------------------|---|
| <u>Reagenzien:</u> | 25xTBE: | 270g Tris 137,5g Borsäure 125ml 0,5M EDTA, pH 8,0 ad 1l H ₂ O |
| | Ethidiumbromidlösung: | 1mg/ml |
| | 10x Auftragspuffer: | 0,25% Bromphenolblau (Sigma) 0,25% Xylencyanol (Sigma) 50% Glycerin |

3.5 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Elektrophoretisch aufgetrennte DNA wurde mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Eluierung und Reinigung der DNA erfolgte unter Verwendung des „QIAquick Gel extraction kit“ und zugehörigem Protokoll der Firma Qiagen.

3.6 Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurden mit dem Spektrophotometer „Genequant“ (Amersham-Pharmacia) bestimmt. Alternativ wurde die Konzentration anhand der Bandenintensität nach Elektrophorese in einem Agarosegel unter Verwendung eines geeigneten Mengenstandards ermittelt.

3.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte nach einem Standardprotokoll [5]. Insertionsfragmente wurden mit geeigneten Restriktionsendonukleasen vorbehandelt und anschließend unter Verwendung

des „QIAquick Gel extraction kit“ und zugehörigem Protokoll der Firma Qiagen gereinigt. Der Klonierungsvektor wurde mit dem gleichen Restriktionsenzym geöffnet (nicht notwendig bei Klonierung von Fragmenten mit nicht kohäsiven Enden) und gereinigt. In einem 20µl Ligationsansatz wurden 50ng Vektor-DNA und Liganden-DNA in 2- bis 3-fachem molarem Überschuß eingesetzt. Die Ligation wurde unter Verwendung von T4-Ligase und zugehörigem Puffer (Roche) über Nacht bei 16°C durchgeführt. Für die anschließende CaCl₂ vermittelte Transformation wurden 10µl, für die Elektrotransformation 2µl des Ansatzes verwendet.

3.8 Klonierung der Expressionskonstrukte

| Konstrukt | Schnittstellen (5',3') | Primer (5',3') | Target-DNA | Annealing-Temp. [°C] |
|----------------|--|----------------|----------------|----------------------|
| mPR3pET24c/3 | <i>Nde</i> I (PCR-Produkt: <i>Ase</i> I)/ <i>Kpn</i> I | DJ845/DJ978 | pET24c/HST | 58 |
| mPR3 pET24c/i2 | <i>Nde</i> I | DJ1201/DJ978 | mPR3pET24c/3 | 58 |
| mPR3pET24c/C-S | <i>Xba</i> I/ <i>Sse</i> 8387 I | DJ1360/DJ1379 | mPR3 pET24c/i2 | 56 |
| mPR3pET24c/F1 | <i>Xba</i> I/ <i>Sse</i> 8387 I (PCR-Prod.: <i>Pst</i> I) | DJ1360/DJ1378 | mPR3 pET24c/i2 | 56 |
| mPR3pET24c/F2 | Vektor: <i>Bss</i> HII partial/ <i>Sse</i> 8387 I PCR-Prod.: <i>Bss</i> HII/ <i>Pst</i> I | DJ1477/DJ1378 | mPR3 pET24c/i2 | 57 |
| mPR3pET24c/F3a | <i>Bss</i> HII (Vektor partial), <i>Sse</i> 8387 I | DJ1400/DJ168 | mPR3 pET24c/i2 | 58 |
| mPR3pET24c/F3b | Vektor: <i>Xba</i> I/ <i>Sna</i> B I PCR-Prod.: <i>Xba</i> I/ <i>Dra</i> I | DJ1360/1516 | mPR3pET24c/F3a | 56 |
| mPR3pET24c/F4 | <i>Xba</i> I/ <i>Sna</i> B I (PCR-Prod. nur <i>Xba</i> I) | DJ1360/DJ1551 | mPR3pET24c/F3a | 58 |
| mPR3pET24c/F5a | <i>Xba</i> I/ <i>Sna</i> B I (PCR-Prod. nur <i>Xba</i> I) | DJ1360/DJ1579 | mPR3pET24c/F3a | 58 |
| mPR3pET24c/F5b | <i>Xba</i> I/ <i>Sna</i> B I (PCR-Prod. nur <i>Xba</i> I) | DJ1360/DJ1580 | mPR3pET24c/F3a | 58 |
| mPR3pET24c/F5c | <i>Xba</i> I/ <i>Sna</i> B I (PCR-Prod. nur <i>Xba</i> I) | DJ1360/DJ1581 | mPR3pET24c/F3a | 58 |
| mPR3pET24c/F6a | <i>Xba</i> I/ <i>Sna</i> B I (PCR-Prod. nur <i>Xba</i> I) | DJ1360/DJ1635 | mPR3pET24c/F3a | 58 |
| mPR3pET24c/F6b | <i>Xba</i> I/ <i>Sna</i> B I (PCR-Prod. nur <i>Xba</i> I) | DJ1360/DJ1636 | mPR3pET24c/F3a | 58 |

3.9 DNA-Transformation

3.9.1 CaCl₂-vermittelte Transformation [62, 69]

a) Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Eine *E. coli* Übernachtskultur (ÜNK) wurde zunächst in LB-Medium verdünnt (OD_{600nm} <0,1). Unter Schütteln wurde bei 37°C inkubiert bis eine OD_{600nm} von 0,5 erreicht wurde. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis und 10-minütigem Abzentrifugieren (3500g, 4°C) wurde das Zentrifugat in 1/5 Volumen eiskalter 0,1M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach weiteren 30-60 Minuten auf Eis wurde noch einmal abzentrifugiert (3500g, 10 Minuten, 4°C) und in 1/10 Volumen eiskalter 0,1M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Für die Lagerung der kompetenten Zellen bei -80°C wurde der CaCl₂-Lösung 20% Glycerin zugesetzt.

b) CaCl₂-vermittelte Transformation

100µl kompetenter Zellen wurden mit 10ng Plasmid-DNA oder 10µl Ligationsansatz gemischt, 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 2 Minuten auf 42°C erwärmt. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurde die Suspension in 1ml LB-Medium inokuliert und für 60 Minuten bei 37°C geschüttelt. Nach kurzem Abzentrifugieren (1700g) wurde das resuspendierte Zentrifugat auf Selektions-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Bei Transformationen, die eine hohe Effizienz erforderlich machten (z.B. bei geringen Mengen an DNA oder Ligationen mit niedriger Effizienz), wurde die Methode der Elektroporation eingesetzt. Um einen Kurzschluß während der Elektroporation zu vermeiden, wurden ausschließlich DNA-Lösungen mit niedriger Salzkonzentration eingesetzt.

3.9.2 Elektrotransformation [136, 84]

a) Herstellung elektrotransformationskompetenter Bakterien

Eine *E. coli* Übernachtskultur (ÜNK) wurde zunächst in LB-Medium verdünnt ($OD_{600nm} < 0,1$). Unter Schütteln wurde bei 37°C inkubiert bis eine OD_{600nm} von 0,5 erreicht wurde. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurde erneut zentrifugiert ($3500g, 4°C$) und anschließend in 50%, 20% und 10% des Ausgangsvolumens 10% Glycerinlösung gewaschen. Die Zellen wurden in 2,5% des Ausgangsvolumens 10% Glycerinlösung resuspendiert und bei -80°C gelagert.

b) Elektroporation

50µl Zellsuspension wurden mit 2ng Plasmid-DNA auf Eis gemischt und in gekühlte 0,1cm-Elektroporationsküvetten überführt. Die Suspension wurde dann für 3-4 msec bei 25µF, 2,5kV, 200 Ohm gepulst. Anschließend wurde 1ml LB-Medium zugegeben und bei 37°C 60 Minuten geschüttelt. Nach kurzem Abzentrifugieren ($1700g$) wurde das resuspendierte Zentrifugat auf Selektions-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.10 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierungen von Plasmiden und PCR-Produkten wurden von der Firma Toplab (Martinsried) unter Verwendung von fluoreszenzfarbstoffmarkierten Nukleotiden nach Sanger durchgeführt [271].

3.11 Rekombinante Proteinexpression in *E. coli*

Rekombinante Expression von mPR3 wurde in einem Expressionssystem der Firma Novagen durchgeführt. In diesem System wird eine konstitutive Expression des Zielgens während der Klonierung ausgeschlossen, indem die codierende Sequenz des zu exprimierenden Gens hinter den T7lac-Promotor des Klonierungsvektors pET24c HST (ein Derivat des Originalvektors, Kap. 2.5) kloniert wird. Da für die Klonierung der Expressionskonstrukte ein Bakterienstamm (*E. coli* DH5α) ohne chromosomal oder episomal codierte T7-Polymerase verwendet wurde, konnte eine negative Selektion aufgrund bakteriostatischer oder bakterizider Effekte des zu exprimierenden Proteins während der Klonierung ausgeschlossen werden. Die durch Sequenzierung ausgewählten Expressionskonstrukte wurden dann in den Expressionsstamm *E. coli* B834 (DE3) transformiert. In diesem Stamm steht die chromosomal kodierte T7-Polymerase aus dem lysogenen Bakteriophagen DE3 unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors. Konstitutive Expression wurde hier durch Zugabe von 2% Glucose als Katabolitrepresor zur ÜNK verhindert. Die ÜNK (100ml LB-Kanamycin, 2% Glucose) wurde zentrifugiert ($1700g$, 5 Minuten) und in 12l LB-Kanamycin resuspendiert. Die Bakterienkultur wurde bei 37°C so lange geschüttelt, bis eine OD_{600nm} von ca. 0,7-0,8 erreicht wurde. Die Induktion der T7-Expression und damit der klonierten DNA erfolgte durch Zugabe von 1mM IPTG. Der Verlauf der Proteinexpression wurde durch stündliche Probenentnahme und anschließender SDS-Gelelektrophorese kontrolliert, um eine optimale Inkubationsdauer zu ermitteln. Im allgemeinen wurde eine maximale Proteinausbeute nach 4 Stunden Inkubation erreicht.

Wie die meisten zytoplasmatisch überexprimierten Proteine in *E. coli* lagen die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Proteine in Form von unlöslichen Aggregaten („inclusion bodies“) vor. Diese

konnten durch Zentrifugation aus dem Bakterienlysat isoliert und anschließend durch Waschen von bakteriellen Proteinen und Membranfragmenten gereinigt werden.

3.11.1 Isolation der Einschlusskörperchen („inclusion body“-Präparation)

Die Expressionskulturen wurden zentrifugiert (5000g, 30 Minuten) und anschließend einmal mit PBS pH7,2 gewaschen. Die Bakterien wurden anschließend in 100ml pro 5l Kulturvolumen Lysepuffer resuspendiert. Nach 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Bakterien mit Ultraschall in 4 Zyklen jeweils 15 Minuten im Eiswasserbad bei 320 Watt aufgeschlossen. Das Bakterienlysat wurde nach Zugabe von 1/3 Volumen Waschpuffer 1 bei Raumtemperatur eine Stunde lang rotiert. Die unlöslichen Proteinaggregate wurden durch Zentrifugation (20000g, 20 Minuten, 4°C) abgetrennt und in Waschpuffer 1 unter Verwendung eines elektrischen Potters resuspendiert. Nach einstündiger Rotation wurde nochmals zentrifugiert und anschließend dieser Waschschrift einmal wiederholt. Danach wurden die gleichen Waschschriffe mit Waschpuffer 2 wiederholt, die erste Rotationsphase wurde jedoch über 24 Stunden ausgeführt. Das Zentrifugat wurde bei -20°C gelagert.

Reagenzien: Lysepuffer: 50mM Tris-HCl
10µg/ml DNase
2mM MgCl₂
0,25mg/ml Lysozym
pH 7,2

Waschpuffer 1: 50mM Tris-HCl
60mM EDTA
1,5M NaCl
6% Triton-X-100
pH 7,2

Waschpuffer 2: 50mM Tris-HCl
60mM EDTA
pH 7,2

3.11.2 Solubilisierung der Proteinaggregate

Die Solubilisierung der Proteinaggregate wurde unter Verwendung von 6M Guanidiniumchlorid durchgeführt. Das häufig eingesetzte Denaturierungsmittel Harnstoff wurde nicht verwendet, um eine Derivatisierung der Aminosäuren (Carbamylierung) zu vermeiden. Um Aggregation während der späteren Rückfaltung zu verhindern, wurde dem Solubilisierungspuffer das Redoxsystem GSSG-GSH (Glutathion in oxidiert und reduzierter Form) zugesetzt. Es führt zur Bildung gemischter Disulfide, die die Löslichkeit des Proteins während der Rückfaltung erhöhen.

Die gereinigten Aggregate wurden in minimalem Volumen Solubilisierungspuffer (ca. 1-2ml pro Liter Expressionskulturvolumen) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension im Eiswasserbad 3 mal 5 Minuten bei 320 Watt beschallt. Die Lösung wurde dann für 24-48 Stunden bei Raumtemperatur rotiert, zentrifugiert (3500g, 30 Minuten) und der Überstand mit 1M HCl auf pH 5,0 eingestellt. Die Entfernung von überschüssigem Glutathion und EDTA erfolgte durch dreimalige Dialyse für 24 Stunden gegen das 50-fache Volumen Dialysepuffer bei 4°C. Die Lösung wurde schließlich filtriert (0,2µm) und sofort für die Renaturierung eingesetzt.

Reagenzien: Solubilisierungspuffer: 6M Guanidiniumchlorid
100mM Tris-HCl
20mM EDTA
15mM GSH (Glutathion, reduziert)
150mM GSSG (Glutathion, oxidiert)
pH 8,0

Dialysepuffer: 6M Guanidiniumchlorid
pH 5,0

3.11.3 Renaturierung von solubilisiertem Protein

Die Renaturierung von solubilisiertem Protein erfolgte durch rasche Verdünnung im Renaturierungspuffer. Die geringe Proteinkonzentration im Rückfaltungspuffer minimiert die Aggregation von ungefalteten Molekülen und Faltungsintermediaten, so daß der einer Kinetik erster Ordnung gehorchende monomolekulare Faltungsprozeß über Aggregationsprozesse höherer Ordnung dominiert. Eine Untergrenze der Proteinkonzentration für maximale Renaturierungsausbeuten war nicht zu erwarten, da Proteinase 3 natürlicherweise als Monomer vorliegt. Weiterhin verringert im allgemeinen die Einführung gemischter Disulfide (bei der Solubilisierung) die Aggregation von frühen Faltungsintermediaten, die häufig bei Renaturierungsprozessen und gleichzeitiger Ausbildung von Disulfidbrücken auftreten. Die korrekte Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken wird durch geringe Mengen von Cystein als reduzierte Thiolkomponente im Renaturierungspuffer katalysiert.

Zur Optimierung der Renaturierungsausbeuten wurde Arginin eingesetzt, das in der Literatur als empirisch gefundener „Faltungsverstärker“ beschrieben ist.

Wie sich im Verlauf dieser Arbeit herausstellte, mußten die Renaturierungsbedingungen weiterhin wegen der Instabilität von rmPR3 in Puffern mit pH-Werten über 7 optimiert werden (näheres zu diesen Eigenschaften von rmPR3 sind in Kap. 4.4.2 beschrieben). Hierzu wurde die Inkubationszeit während der Renaturierung minimiert und die Puffertemperaturen entsprechend angepaßt.

Um eine möglichst effiziente Rückfaltung zu gewährleisten, gleichzeitig aber Degradationsprozesse der PR3 zu minimieren, wurde der Renaturierungspuffer auf ca. 15°C temperiert (durch Mischen von 2/3 Volumen Puffer mit Raumtemperatur und 1/3 Volumen auf 4°C vorgekühltem Puffer). Das Proteinsolubilisat (ca. 20-40ml, max. 5mg/ml) wurde unter Rühren dem Renaturierungspuffer (mind. 100-faches Volumen der Solubilisats) tropfenweise zugemischt und anschließend ohne weitere Agitation über Nacht auf 4°C abgekühlt. Der Rückfaltungsansatz wurde dann auf ca. 100-200ml durch Ultrafiltration (ProVario, 10kDa-Filter, PallGelman) bei 4°C eingeengt und sofort dialysiert. Die Ansätze wurden schließlich spektrophotometrisch quantifiziert und durch SDS-PAGE analysiert.

Reagenzien: Renaturierungspuffer: 50mM Tris-HCl
0,6M L-Arginin
20mM CaCl₂
1mM EDTA
100mM NaCl
0,5mM Cystein
pH 8,5

Dialysepuffer: 100mM NaCl
50 mM NaOAc
pH 5,5

3.11.4 Reinigung von renaturierter rmPR3 über FPLC

Aufgrund der hohen Hydrophobizität von rmPR3 wurde als Chromatographie-Matrix Phenyl-Sepharose („High-Performance“, Amersham-Pharmacia) eingesetzt. Die als HIC („hydrophobic interaction chromatography“) beschriebene Methode beruht auf der reversiblen, hydrophoben Interaktion zwischen Protein und der Oberfläche des Chromatographiemediums.

Die Aufreinigung des renaturierten Zymogens erfolgte bei Raumtemperatur unter Verwendung der FPLC-Anlage von Amersham-Pharmacia. Wegen der Instabilität (Kap. 4.4.2) von rmPR3 wurde die Reinigung von aktivierter rmPR3 unter Verwendung des „Econo-System“ von Bio-Rad bei 4°C durchgeführt.

Die Proteinlösung wurde über eine der Auftragspumpen aufgetragen, nachdem das Säulenmaterial mit 10 Säulenvolumina 0,3M NaOAc pH 5,5 äquilibriert wurde. Anschließend wurde die Säule mit 5 Säulenvolumina 0,05M NaOAc gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte über einen Isopropanolgradienten mit 5 Säulenvolumina 0,05M NaOAc bis 0,05M NaOAc/30% Isopropanol (Vol./Vol.). Die proteinhaltigen Fraktionen wurden gesammelt und 3 mal gegen 50mM NaOAc/100mM NaCl bei 4°C dialysiert.

3.11.5 Aktivierung von rmPR3

Da die Expression von rmPR3 in *E. coli* als inaktives Zymogen mit dem Dipeptid Met-Glu als Prosequenz erfolgte, wurde durch Abspaltung des Propeptids mit der Diaminoexopeptidase Cathepsin C der reife N-Terminus generiert. Wie von Murakami und Mitarbeitern postuliert, können Serinproteasen auch ohne spezifische Stopsequenzen (Arg/Lys an Position 1 des Dipeptids, Pro an zweiter oder dritter Position) konvertiert werden, weil der nach der Abspaltung des Dipeptids generierte N-Terminus Ile-16 eine Salzbrücke mit Asp-194 (Chymotrypsinogennumerierung) ausbildet, die eine weitere sukzessive Abspaltung von Dipeptiden verhindert [218].

Da die renaturierten Proteinpräparationen nur wenig bakterielle Proteinkontaminationen aufwiesen, wurden ohne weitere Aufreinigung 0,5U Cathepsin C (Sigma) pro mg der dialysierten Proteinlösung bei Raumtemperatur zugesetzt. Um eine Oxidation des aktiven Zentrums der Cysteinprotease Cathepsin C zu vermeiden, wurde die Reaktion in Anwesenheit von 1mM Dithioerythritol (DTE) durchgeführt. Der Reaktionsverlauf wurde durch Messung der enzymatischen Aktivität regelmäßig entnommener Proben verfolgt. Die Konvertierungsreaktion war nach 5-8 Stunden abgeschlossen. Anschließend wurde 3 mal gegen 50mM NaOAc/100mM NaCl bei 4°C dialysiert. Die Aufreinigung der konvertierten rmPR3 erfolgte über HIC wie unter Kap. 3.11.4 beschrieben. Der Erfolg der Konvertierung wurde weiterhin durch N-terminale Proteinsequenzierung bestätigt.

3.12 Größenbestimmung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamidgellelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinauftrennung wurde nach Standardprotokollen [5] in Mini-Protean Apparaturen (Bio-Rad) durchgeführt. Dem Probenauftragspuffer nach Laemmli wurden aufgrund der geringen Löslichkeit von rmPR3-Aggregaten zusätzlich 10% β -Mercaptoäthanol und 2% SDS zugegeben.

Reagenzien: Sammelgel (5ml): 3,6ml H₂O
 0,63ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid (29:0,8)
 0,63ml 1 M Tris-HCl pH 6,8
 0,05ml 10% SDS
 0,05ml 10% Ammoniumpersulfat

| | |
|----------------------------|---|
| | 0,005ml TEMED |
| Trenngel (15%, 10ml): | 2,3ml H ₂ O 5ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid (29:0,8) 2,5ml Tris-HCl pH 8,8 0,1ml 10% SDS 0,1ml 10% Ammoniumpersulfat 0,004ml TEMED |
| Laufpuffer (10x): | 248mM Tris 1,9M Glycin 1% SDS |
| Probenauftragspuffer (4x): | 200mM Tris-HCl pH 6,8 40% Glycerin 30% β -Mercaptoäthanol 10% SDS 0,2% Bromphenolblau |

Molekulargewichtsstandards wurden von Bio-Rad (low-range molecular weight standard) und Novex (für *Western Blot*, „SeeBlue Plus2 Pre-stained“) bezogen.

3.13 Proteindetektion

3.13.1 Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blue [100, 209, 340]

Polyacrylamidgele wurden für eine Stunde in Färbelösung bei Raumtemperatur geschwenkt und anschließend solange in Entfärbelösung inkubiert, bis ein möglichst großes Signal-Hintergrund-Verhältnis erreicht war. Die Lagerung der Gele erfolgte in H₂O.

| | | |
|--------------------|-----------------|---|
| <u>Reagenzien:</u> | Färbelösung: | 0,25% Coomassie Brilliant Blue 40% Methanol 7% Essigsäure |
| | Entfärbelösung: | 10% Äthanol 7% Essigsäure |

3.13.2 Proteinfärbung mit Silbernitrat [28]

Polyacrylamidgele wurden eine Stunde in Fixierlösung und anschließend 3 mal 20 Minuten in 50% Äthanol geschwenkt. Danach wurde eine Minute in Thiosulfatlösung, 3 mal 20 Sekunden in H₂O, 20 Minuten in Silbernitratlösung unter Schwenken inkubiert und schließlich nach 3 mal 20 Sekunden Waschen in H₂O wurden mit Entwicklerlösung die Banden detektiert. Die Reaktion wurde mit H₂O abgestoppt, dann für 10 Minuten mit 50% Methanol/12% Essigsäure und für 30 Minuten mit 50% Methanol fixiert. Im Falle einer hohen Hintergrundfärbung wurde mit Farmers Lösung inkubiert, bis ein möglichst großes Signal-Hintergrund-Verhältnis erreicht war. Die Lagerung der Gele erfolgte in H₂O.

| | | |
|--------------------|---------------------|---|
| <u>Reagenzien:</u> | Fixierer: | 50% Methanol 12% Essigsäure 0,5ml/l 37% Formaldehyd |
| | Thiosulfatlösung: | 0,2g/l Natriumthiosulfat5-hydrat |
| | Silbernitratlösung: | 2g/l Silbernitrat 750µl/l 37% Formaldehyd |
| | Entwicklerlösung: | 60g/l Natriumcarbonat 4mg/l Natriumthiosulfat5-hydrat 0,5ml/l 37% Formaldehyd |
| | Farmers Lösung: | Lösung1: 20% Natriumthiosulfat5-hydrat Lösung2: 1% Kaliumhexacyanoferrat Gebrauchslösung: vor Gebrauch Lösung 1 und 2 1:100 verdünnt und zu gleichen Teilen gemischt |

3.13.3 Western-Blot Analyse von Proteinen [318, 39]

Die Proteinlösungen wurden - wie unter Kap. 3.12 beschrieben - elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels nassem Elektrobplot auf eine „Hybond ECL“ (Nitrocellulose)-Membran (Amersham-Pharmacia) für ECL-vermittelte Antikörperdetektion oder auf „Immobilon-PSQ“ (PVDF)-Membranen (Millipore) für N-terminale Proteinsequenzierungen übertragen. Für die Proteinsequenzierung bestimmte Membranen wurden nach dem Proteintransfer direkt 20 Sekunden mit Coomassie-Brilliant-Lösung gefärbt, und mit 30% Essigsäure entfärbt, bis ein möglichst großes Signal-Hintergrund-Verhältnis erreicht war.

Durchführung: Die Membran wurde zunächst kurz in Transfer-Puffer äquilibriert und anschließend für eine Stunde bei 100V gekühlt unter Verwendung der Bio-Rad Protean Blotting-Apparatur geblottet. Die Membran wurde dann für eine Stunde bei Raumtemperatur mit TBS-T/5% Magermilchpulver blockiert, kurz in TBS-T gewaschen und schließlich über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper in TBS-T/2% Magermilchpulver (Antiseren soweit nicht anders angegeben 1:100 verdünnt) unter Rotation inkubiert. Nach 3-maligem 10-minütigem Waschen in TBS-T wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper (für Maus-Antiseren: Anti-Maus-Ig-POD, 1:1000 verdünnt, Boehringer/Roche) in TBS-T/2% Magermilchpulver 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3 mal 10-minütigem Waschen mit TBS-T wurde die ECL-Substratlösung nach Herstellerangaben (Lösung 1 zu gleichen Teilen mit Lösung 2 gemischt) auf die Membran gegeben und nach Abtropfen in Frischhaltefolie eingepackt. Die Exposition eines ECL-Films (Amersham-Pharmacia) erfolgte in einer Expositionskammer je nach Signalstärke für 20 Sekunden bis 10 Minuten.

| | | |
|--------------------|-----------------|--|
| <u>Reagenzien:</u> | Transferpuffer: | 25mM Tris 200mM Glycin 20% Methanol 0,1% SDS |
| | TBS-T: | 20mM Tris-HCl 137mM NaCl 0,1% Tween-20 pH 7,6 |

3.14 Proteinsequenzierung [85]

Die N-terminale Ansequenzierung von aktivierter rmPR3 zur Überprüfung der Vollständigkeit der Konvertierung und Identifizierung von Spaltstellen bei der rmPR3-Degradation wurde im Max-Planck-Institut für Biochemie in Auftrag gegeben. Gereinigte Proteinlösungen wurden direkt nach der Methode des Edmann-Abbaus analysiert, Proteinfragmente wurden zuvor aus PVDF-Membranen eluiert.

3.15 Colorimetrische Proteinquantifizierung [234]

Proteinlösungen mit Konzentrationen von mindestens 100µg/ml wurden mit einer nach Lowry modifizierten Methode quantifiziert. Je 50µl der Proteinlösungen wurden in einer Verdünnungsreihe mit Lowry-Reagenz (Sigma) gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 25µl Phenol-Reagenz nach Folin und Ciocalteu (Sigma) zugemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Farbentwicklung bei 730nm wurde mit dem *ELISA-Reader* quantifiziert. Als Proteinstandards wurden hPR3 oder BSA in verschiedenen Verdünnungen verwendet.

3.16 Spektrophotometrische Proteinquantifizierung [189]

a) Proteinquantifizierung durch Bestimmung der Absorption bei 280nm

Die Bestimmung der Proteinkonzentration durch Messung der Absorption bei 280nm beruht auf der Absorption von UV-Licht durch aromatische Aminosäuren, vorwiegend Tryptophan, Tyrosin und in geringerem Maß Phenylalanin. Die Proteinkonzentration errechnet sich nach

$$c \text{ (mg/ml)} = \frac{A_{280} \times MW}{\epsilon_{280} \times b}$$

mit A_{280} =gemessene Absorption, MW=Molekulargewicht, ϵ_{280} =molarer Absorptionskoeffizient, b=Schichtdicke.

Der molare Absorptionskoeffizient wurde anhand der Aminosäuresequenz mit dem Computerprogramm „Peptidesort“ des „GCG-Package“ (Wisconsin) errechnet. Die Messungen wurden in einer Quarzküvette mit der entsprechenden Pufferlösung als Referenz in einem Spektrophotometer (Shimadzu) durchgeführt. Da die Absorption nur in einem Konzentrationsbereich von 200-3000µg/ml eine lineare Funktion der Proteinkonzentration liefert, wurden Proteinlösungen bis 50µg/ml nach Methode b) quantifiziert.

b) Proteinquantifizierung durch Bestimmung der Absorption bei 205nm

Die Bestimmung der Proteinkonzentration durch Messung der Absorption bei 205nm beruht auf der Absorption durch Peptidbindungen. Da der molare Absorptionskoeffizient ϵ_{205} wesentlich höher als ϵ_{280} ist, können mit dieser Methode Proteinlösungen von 1-100µg/ml quantifiziert werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Proteinlösungen wurden aufgrund der Hydrophobizität von rmPR3 meist nicht über 50µg/ml konzentriert, weshalb die Konzentrationsangaben im wesentlichen durch diese Methode abgeleitet wurden. OD_{205} für rekombinante mPR3 wurde aus Messungen mit nicht aufgereinigten Proteinlösungen höherer Konzentration ermittelt.

Die Messungen wurden in einer Quarzküvette mit 0,01% Brij35 (Sigma) als Referenz in einem Spektrophotometer (Shimadzu) durchgeführt. Die zu messenden Proteinlösungen wurden mindestens 1:10 in 0,01% Brij35 verdünnt.

3.17 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von rekombinanter mPR3

Die Bestimmungen der enzymatischen Aktivität von hPR3/rmPR3/hNE wurden als chromogene Tests in 96-Napf-Platten durchgeführt und im *ELISA-reader* quantifiziert. Als synthetisches, chromogenes Substrat wurde ausschließlich N-Methoxysuccinyl-alanyl-alanyl-prolyl-valyl-p-nitroanilid (AAPV-pNA, Enzyme Systems Products und Sigma) eingesetzt [220]. Die Abspaltung des Tetrapeptids durch PR3/NE entläßt die Paranitroanilidgruppe, die durch einen hohen Absorptionskoeffizienten bei 405-410nm ($\epsilon=8800\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) gekennzeichnet ist. Alle Tests wurden in 0,1M Tris-HCl pH 8,1, 100mM NaCl, 10% DMSO, 1mM AAPV-pNA durchgeführt. Die eingesetzten Enzymmengen, Inkubationszeiten und zugesetzte Additive sind in Kap. 4.5 bei den jeweiligen Versuchsbeschreibungen aufgeführt. Um die Löslichkeit von rmPR3 im wässrigen Milieu zu erhöhen, wurde dem Versuchsansatz 1% Octylglucosid oder 0,05% Triton-X100 zugesetzt.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeiten wurde gefunden, daß die gemessene enzymatische Aktivität rekombinant hergestellter mPR3 in Puffern mit pH-Werten um 8 starken Schwankungen unterworfen ist (Kap. 4.5.2). Um die Ursachen dieser Beobachtung zu analysieren, wurde rekombinant hergestellte mPR3 und deren Zymogen in verschiedenen Konzentrationen mit unterschiedlichen Reaktionspartnern (genaue Angaben hierzu im Kap. 4.5.2) inkubiert und die enzymatische Aktivität des Gemisches, wie beschrieben, ermittelt. Diese Experimente wurden ausschließlich in 0,1M Tris-HCl pH 8,1/100mM NaCl/2mM EDTA in Abwesenheit von Detergenzien durchgeführt.

3.18 Kovalente Kopplung von hNE an Cyanogenbromid-aktivierte Sepharose

50mg Cyanogenbromid-aktivierte Sepharose (Amersham-Pharmacia) wurde 20 mal mit 500µl 1mM HCl in "Mobicol"-Zentrifugengefäßen mit Filtereinsatz (Mobitec) gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschritten wurde 1 Minute inkubiert. Anschließend wurde die Matrixsuspension in 250µl 50mM NaOAc resuspendiert. 10µl der Suspension wurde mit 5µl hNE (1µg/µl, Calbiochem), 60µl 1M NaCl und 95µl 50mM NaOAc gemischt und über Nacht bei 4°C rotiert. Anschließend wurde für 2 Minuten zentrifugiert (20000g, 4°C), der Überstand abgenommen und das Zentrifugat 5 Stunden in 200µl 0,1M Tris-HCl pH 8,1 bei Raumtemperatur rotiert. Die Suspension wurde schließlich in "Mobicol"-Zentrifugengefäßen abwechselnd je 4 mal mit 0,1M NaHCO₃/0,5M NaCl pH 8,3 und 0,1M NaOAc/0,5M NaCl pH 4 gewaschen. Die Sepharosematrix wurde in 125µl 0,1M Tris-HCl pH 8,1 aufgenommen.

3.19 Strukturmodellierung von mPR3

Die Aminosäuresequenz von muriner PR3 wurde mit der Sequenz der humanen Proteinase 3 und anderer Serinproteasen, deren 3D-Strukturen bekannt sind, aliniert und daraus die dreidimensionale Struktur abgeleitet. Hierzu wurde ein automatisiertes Verfahren angewandt, das über die Internetadresse „<http://www.expasy.ch>“ (Stand: 1.1.2001) angeboten wird. Der Strukturdatensatz wurde über den Internet-Server „Swiss-Prot“ nach dem „First-Approach“-Modus erstellt und die gewonnenen Daten unter Verwendung des „Pdb-Viewer“-Programms (Glaxo-Wellcome Experimental Research) dargestellt. Dieses Verfahren liefert eine Annäherung an die Kristallstruktur des untersuchten Proteins, deren Genauigkeit sich mit zunehmender Sequenzhomologie erhöht [129].

3.20 Tierexperimentelle Methoden

3.20.1 Tierhaltung

Als Versuchstiere wurden ausschließlich Mäuse des Stamms 129/SV/EV aus eigener Nachzucht verwendet, die separat homozygot gehalten wurden. Die Haltung erfolgte in temperierten, künstlich beleuchteten Räumen des institutseigenen Tierhauses. Für Kreuzungen wurden in der Regel 2 weibliche Tiere mit einem Männchen gekreuzt. Die Nachkommen wurden nach ca. 3 Wochen von den Eltern getrennt und gleichgeschlechtliche Tiere desselben Wurfes in Gruppen bis höchstens 5 bzw. 15 Tieren (je nach Käfiggröße) gehalten. Stichprobenartig wurden den Mäusen Schwanzbiopsien entnommen und mittels PCR genetisch charakterisiert.

3.20.2 Genetische Charakterisierung von Zuchtmäusen

Um PR3/NE-defiziente Mäuse von WT-Tieren zu unterscheiden, wurde genomische DNA mittels PCR unter Verwendung geeigneter Sonden (*Primer*) hinsichtlich des PR3/NE-Lokus analysiert (Abb. 3.1). Der WT-Lokus wurde unter Verwendung zweier Sonden zwischen Exon 2 (DJ186, Maus-Proteinase3, kodierender Strang) und Exon 4 (DJ187, Maus-Proteinase3, Gegenstrang) amplifiziert. Der nach klassischer Technik [311] rekombinierte Locus (Klon O198, [105]) wurde anhand des Neomycin-Resistenzgens identifiziert (DJ104: Maus-Elastase-2, Exon 5, Gegenstrang und DJ495:Neomycin-Resistenzgen, kodierender Strang). PR3/NE-defiziente Mäuse mit *Cre-loxP*-vermittelter Deletion des Neomycinresistenzgens (Klon D48, [286, 105]) wurden unter Verwendung der Primer DJ104 (Maus-Elastase-2, Exon 5, Gegenstrang) und DJ218 (Maus-Proteinase3, Intron 1, codierender Strang) identifiziert. Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels horizontaler Gelelektrophorese untersucht (Kap. 3.4). Die Genotypen konnten dann aufgrund der unterschiedlichen Größen der PCR-Produkte ermittelt werden.

a) Präparation genomischer DNA aus Schwanzgewebe

PR3/NE-defizienten Mäusen wurden im Alter von ca. 3 Wochen ein etwa 2-3cm langes Stück der Schwanzspitze entnommen. Das Gewebe wurde über Nacht bei 55°C mit 500µl/ml Proteinase K in 600µl Puffer K inkubiert, 2 Minuten bei 20000g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die im Überstand vorhandenen Proteine wurden durch Zugabe von 250µl 5M NaCl präzipitiert und anschließend 2 mal bei 20000g für 15 Minuten abzentrifugiert. Die DNA-Präzipitation erfolgte durch Zugabe von 600µl 2-Propanol, kurzes Mischen und anschließender Zentrifugation für eine Minute bei 20000g. Das DNA-Zentrifugat wurde mit 800µl 70% Äthanol gewaschen und anschließend für 15-30 Minuten bei 40°C getrocknet. Die DNA wurde schließlich in 50-100µl H₂O_{dd} für 1 Stunde bei 40°C und leichtem Schütteln gelöst.

Reagenzien: Puffer K: 50mM Tris-HCl
 100mM EDTA
 100mM NaCl
 1% SDS
 pH 8,0

b) Charakterisierung genomischer DNA mittels PCR

Die genomische DNA wurde vor Gebrauch 1:10 in H₂O_{dd} verdünnt. Für jede DNA-Präparation wurden separat 2 Amplifizierungsreaktionen durchgeführt: eine Reaktion für die Amplifikation des

Knock-out-Lokus, die zweite für die Amplifikation des WT-Allels. Diese Vorgehensweise ermöglichte die eindeutige Identifizierung von sowohl homozygoten als auch heterozygoten Tieren. Alle Amplifikationsreaktionen wurden in 35 Zyklen unter Verwendung von *Taq*-DNA-Polymerase und zugehörigen Puffern der Firma Qiagen laut Herstellerangaben verwendet. Zur Erhöhung der Spezifität wurde zusätzlich das Additiv „Q-Solution“ laut Herstellerangaben eingesetzt.

| | |
|------------------------------|---|
| <u>Reaktionsbedingungen:</u> | Amplifikation des rekombinanten O198-Allels: |
| | Denaturierung: 94°C 1min |
| | Annealing: Primer DJ104, DJ495, 60°C 1min |
| | Elongation: 72°C 1min 45s |
| | Amplifikation des rekombinanten D48-Allels: |
| | Denaturierung: 94°C 1min |
| | Annealing: Primer DJ104, DJ218, 58°C 1min |
| | Elongation: 72°C 1min 30s |
| | Amplifikation des rekombinanten Wildtyp-Allels: |
| | Denaturierung: 94°C 1min |
| | Annealing: Primer DJ186, DJ187, 60°C 1min |
| | Elongation: 72°C 1min 45s |
| | Primerkonzentration (final): 0,2mM |
| | dNTP-Konz. (final): 0,2mM |
| | template-DNA: 1µl/Reaktion |

Nukleotidsequenz der eingesetzten Primer:

DJ 104 5'-TCGGTCTTTGGGATGGGTAAG-3'
DJ 186 5'-CTCGGCCTTATGTGGCATCC-3'
DJ 187 5'-CCGGCATAGGAAGGTGACCA-3'
DJ 218 5'-AGCTCCCATGCTGTGTTTC-3'
DJ 495 5'-CTGCTCTTTACTGAAGGCTC-3'

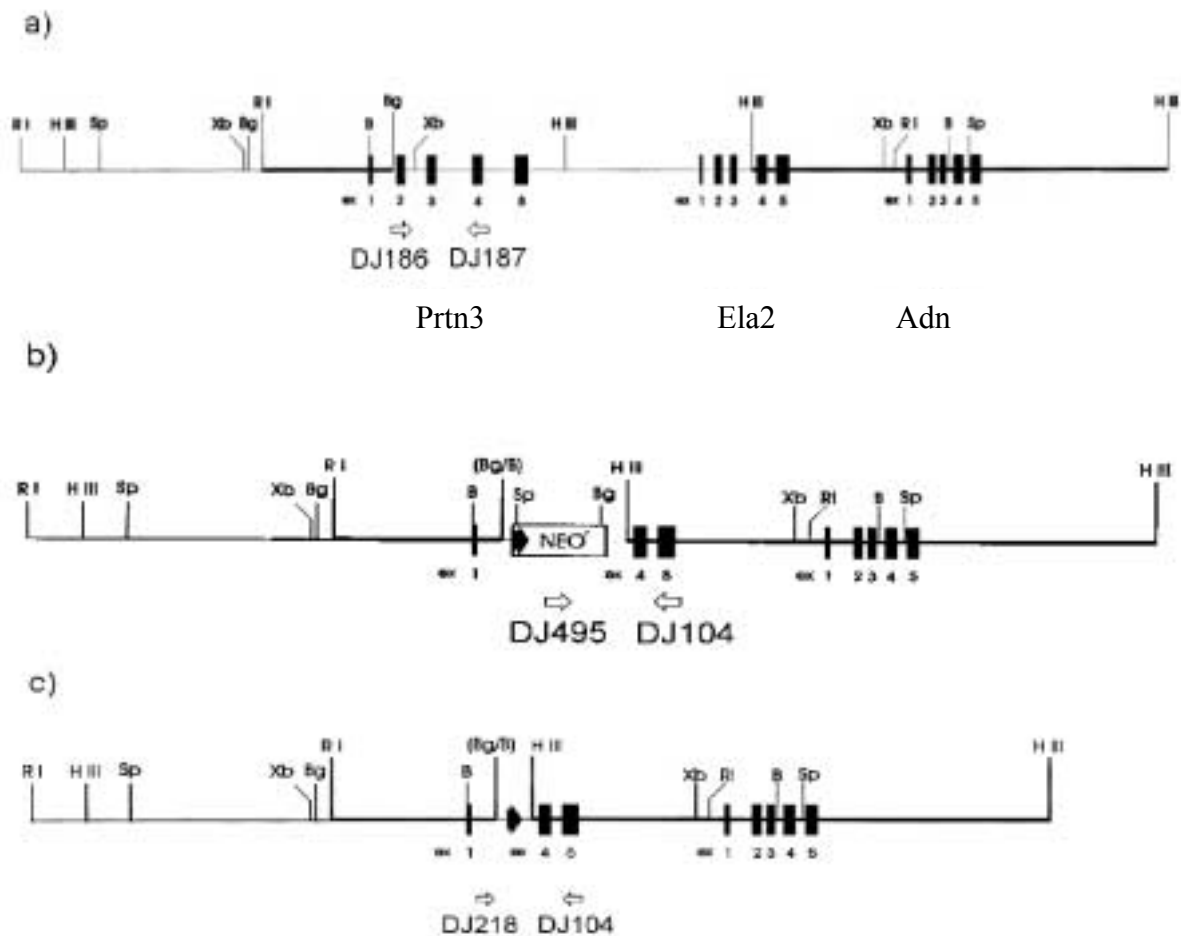


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Maus PR3/NE-Lokus:

a) Wildtyp-Allel

b) Rekombinantes Allel 0198: Durch die rekombinante Insertion des „targeting vectors“ sind die Exons 2-5 des PR3-Gens (Prtn3) sowie Exons 1-3 des Neutrophilen-Elastase-Gens (Ela2) deletiert. Die Identifizierung des rekombinanten Allels erfolgte durch Amplifikation mit den Oligonukleotiden DJ104 und DJ495.

c) Rekombinantes Allel D48: Durch Cre-loxP-vermittelte Rekombination ist die Selektionskassette deletiert. Die Identifizierung des rekombinanten Allels erfolgte durch Amplifikation mit den Oligonukleotiden DJ104 und DJ218.

Exons sind als schwarze Balken dargestellt, Primer sind als Pfeile skizziert; Adn, Adipsin; Restriktionsschnittstellen: B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; HIII, *Hind*III; RI, *Eco*RI; Sp, *Spe*I; Xb, *Xba* I. Abbildung verändert aus [105].

3.21 Herstellung polyklonaler mPR3-Antisera in PR3/NE-defizienten Mäusen

3.21.1 Immunisierung

Wie in Kap. 4.6 beschrieben, konnte in Wildtyp-Mäusen aufgrund von Toleranz kein Antiserum mit ausreichenden Antikörperspiegeln generiert werden. Daher wurden PR3/NE-defiziente Mäuse für die Herstellung polyklonaler mPR3-Antisera herangezogen. Die Autoantikörper („anti neutrophil cytoplasmic autoantibodies“, ANCA) bei Wegener’scher Granulomatose sind durch ihre Spezifität für

Konformationsepitope der PR3 gekennzeichnet [25]. Aus diesem Grund wurde für Immunisierungen ausschließlich renaturierte PR3 oder deren Zymogen eingesetzt.

Zunächst wurde den Mäusen über die Schwanzvene ca. 200µl Blut entnommen, das als Negativkontrolle bei der Überprüfung des Immunisierungsverlaufs herangezogen wurde. Dann wurde für jede Maus aus 5µg rmPR3 oder pro-rmPR3 (108µl bzw. 125µl) und dem gleichen Volumen CFA („complete Freund’s adjuvant“, Sigma) durch wiederholtes Pressen durch eine Schlauchverbindung (Durchmesser 0,4mm, Merck Eurolab) zweier Spritzen eine Emulsion hergestellt. Diese wurde subkutan in den dorsalen Schwanzwurzelbereich injiziert. Nach 2 Wochen wurde den Tieren, wie oben beschrieben, eine Blutprobe entnommen. Um eine Immunreaktion gegen die in CFA enthaltenen *M. tuberculosis*-Antigene zu minimieren, wurden alle folgenden Auffrischungsimmunisierungen mit einer Emulsion aus Antigen und IFA („incomplete Freund’s adjuvant“) durchgeführt. Die erste Auffrischungsimmunisierung erfolgte subkutan im Genick ca. 3 Wochen nach der ersten Immunisierung, die zweite folgte ca. 2 Wochen später in subkutan applizierten 50-60µl-Depots in den Achselhöhlen. Weitere Blutproben wurden jeweils 12 Tage nach den Auffrischungsimmunisierungen entnommen. Um möglichst große Mengen an Antiserum zu erhalten, wurden die Mäuse eine Woche nach der letzten Blutentnahme unter Vollnarkose ausgeblutet (Volumen ca. 1ml). Die Quantifizierung der Antikörperspiegel erfolgte durch Festphasenimmunoassays (ELISA, „enzyme linked immunosorbent assay“).

Die Herstellung von Kontrollserum erfolgte in gleicher Weise, jedoch wurden die Emulsionen aus CFA bzw. IFA und 100mM NaCl/50mM Natriumacetat pH 5,5 hergestellt.

3.21.2 Herstellung von Serum

Frisch entnommene Blutproben wurden für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, was eine vollständige Koagulation erlaubt. Anschließend wurden die Proben über Nacht bei 4°C gelagert. Das Serum wurde dann zunächst abpipettiert und der Blutkuchen für 10 Minuten bei 2700g zentrifugiert. Das Serum wurde erneut abpipettiert und mit dem zuvor abgenommenen Serum vereint. Das Serum wurde schließlich zwei mal zentrifugiert (2700g, 10 Minuten), portioniert und bei -20°C gelagert.

3.22 Passive Immunisierung von Wildtyp-Mäusen

Da eine aktive Immunisierung von Wildtyp-Mäusen mit dem Autoantigen rmPR3 aufgrund von Toleranz nicht durchführbar war, wurde autologes Immuneserum, das in kongenen PR3/NE-defizienten Mäusen hergestellt wurde, auf Wildtyp-Tiere übertragen. Um eine ausreichende Menge an standardisiertem Serum zur Verfügung zu haben, wurden von wenigstens 4 Tieren alle Serumproben vereint, die 12 Tage nach der ersten Auffrischungsimmunisierung oder später gewonnen wurden. Die Quantifizierung der Antikörperspiegel erfolgte durch Festphasenimmunoassays (ELISA, „enzyme linked immunosorbent assay“).

Vor der ersten Übertragung von Antiserum wurde den Mäusen über die Schwanzvene ca. 200µl Blut entnommen, das als Negativkontrolle bei der Überprüfung des Immunisierungsverlaufs herangezogen wurde. Danach wurde den Tieren über die Schwanzvene 250µl Serum verabreicht. Auffrischungsimmunisierungen mit 100µl Serum erfolgten 14, 35 und 63 Tage nach der ersten Injektion. Vor jeder Injektion wurde den Tieren etwa 100µl Blut entnommen.

3.23 Blutbildanalyse

Für Analysen des Differentialblutbildes wurde den zu untersuchenden Tieren ein Tropfen Blut über die Schwanzvene abgenommen und auf einen Glasobjektträger getropft. Mit einem zweiten

Objektträger wurde der Tropfen durch kurzes Überstreichen gleichmäßig verteilt. Die Präparate wurden luftgetrocknet und anschließend mit Hematoxylin/Eosin gefärbt. Hierzu wurden die Präparate hintereinander jeweils 10 mal kurz in die Lösungen 1 bis 3 des „Diff-Quik“-Färbesets (Dade Diagnostika) getaucht, anschließend kurz mit $H_2O_{dest.}$ abgespült und luftgetrocknet. Die Auswertung erfolgte am Mikroskop (Vergrößerung 630-fach in Immersionsöl, Zeiss) durch zufällige Auswahl eines zentral gelegenen Objektivfeldes. Unter vertikaler und horizontaler Verschiebung des Objektivfeldes wurden 100 Leukozyten anhand ihrer Färbung als Neutrophile, Eosinophile, Basophile und Lymphozyten identifiziert.

Zur Bestimmung von Zellzahlen pro Volumeneinheit wurden von den gleichen Tieren Blutproben entnommen. Die Lyse von Erythrozyten erfolgte durch Inkubation von 2 μ l heparinisiertem (20U/ml, Sigma) Vollblut mit 18 μ l Ammoniumchloridpuffer für 5 Minuten auf Eis. Die Zellsuspension wurde in 80 μ l Türks Lösung (Merck) verdünnt und die Leukozytenzahl in einer Hämozytometerkammer („improved Neubauer chamber“, Brand) im Durchlichtmikroskop (Leica) bestimmt. Die Zellzahl pro Volumeneinheit wurde aus $Zellen/ml = \text{durchschnittliche Zellzahl pro Zählquadrat} \times 500000$ errechnet. Für die Bestimmung von Neutrophilenzahlen pro Volumeneinheit wurden die Ergebnisse aus dem Differentialblutbild, ausgedrückt als prozentualer Anteil, mit den Ergebnissen der Hämozytometerzählung multipliziert.

Reagenzien: Ammoniumchloridpuffer: 150mM Ammoniumchlorid
2mM Kaliumhydrogencarbonat
0,1mM EDTA
pH 7,2-7,4

3.24 Gewinnung von neutrophilen Granulozyten aus der Peritonealhöhle

Aufgrund des geringen Blutvolumens einer Maus (ca. 1-1,5ml) gestaltet sich die Isolation von Neutrophilen aus Mausblut schwierig und erfordert eine hohe Zahl an Tieren. Eine wesentlich einfachere Methode zur Gewinnung von neutrophilen Granulozyten stellt die Isolation von infiltrierenden Neutrophilen aus der Peritonealhöhle nach Induktion einer Peritonitis dar. In der Regel lassen sich ca. $2-7 \times 10^6$ Neutrophile pro Maus aus der Peritonealhöhle isolieren, das Blut einer Maus liefert hingegen nur $0,5 \times 10^6 - 1 \times 10^6$ neutrophile Granulozyten [328]. Die physiologischen Eigenschaften peritonealer Zellen können allerdings durch die Exposition mit inflammatorischen Agentien verändert sein [78, 5]. Die Induktion mit Casein liefert partiell aktivierte Zellen. Diese sind deshalb für Analysen, die ruhende Zellen erfordern, nicht geeignet.

3.24.1 Gewinnung von Peritonealzellen

Zunächst wurde den Mäusen intraperitoneal 1ml 9% Caseinlösung verabreicht (für den unter Kap. 3.13.3 beschriebenen *Western Blot* wurde am Vortag eine zusätzliche Casein-Injektion durchgeführt, um die Anzahl der Neutrophilen im Exsudat zu erhöhen). Nach 3 Stunden wurde das Peritoneum chirurgisch freigelegt und mit einer Spritze 3ml PBS/0,02% EDTA in die Peritonealhöhle injiziert. Die Peritonealflüssigkeit wurde abgesaugt und der Spülvorgang einmal wiederholt. Die gesammelte Peritonealflüssigkeit wurde dann 10 Minuten bei 200g zentrifugiert und schließlich einmal mit PBS gewaschen. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Reagenzien: 9% Caseinlösung: 9% Natrium-Casein
0,9mM Calciumchlorid
0,5mM Magnesiumchlorid
gelöst in PBS pH 7,2

3.24.2 Isolation von neutrophilen Granulozyten aus Peritonealflüssigkeit [90]

Peritoneale Granulozyten wurden über einen diskontinuierlichen Dichtegradienten von kontaminierenden Zellen getrennt. Durch die Schichtung zweier Polysaccharoselösungen unterschiedlicher Dichte können die Zellen entsprechend ihrer spezifischen Dichte aufgetrennt werden. Mononukleäre Zellen mit der geringsten Dichte finden sich nach Zentrifugation in der oberen Plasmaphase wieder, Erythrozyten hingegen sammeln sich aufgrund ihrer hohen spezifischen Dichte am Gefäßboden. Granulozyten mit einer spezifischen Dichte von ca. 1,1 können aus der Interphase der beiden Polysaccharoselösungen isoliert werden. Eine Trennung der neutrophilen Granulozyten von anderen polymorphkernigen Zellen ist mit dieser Methode nicht möglich. Kontaminationen durch Eosinophile und Mastzellen im Peritonealexsudat belaufen sich in der Regel auf nicht mehr als je 1% [328, 5].

In einem 15ml-Polypropylengefäß wurden 3ml Histopaque1077 (Sigma) vorsichtig auf 3ml Histopaque1119 geschichtet. Das wie oben beschrieben hergestellte Peritonealexsudat wurde noch zwei mal mit PBS gewaschen und anschließend auf die obere Histopaque-Schicht gegeben. Die Zellpopulationen wurden durch Zentrifugation (30 Minuten, 700g, ungebremst) aufgetrennt und die Granulozyten aus der Interphase zwischen beiden Polysaccharoselösungen mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Danach wurden die Zellen 3 mal mit PBS gewaschen und die Zellzahl durch Hämozytometerzählung (Kap. 3.23) bestimmt. Weiterhin wurde die Zellsuspension durch Hämatoxylin/Eosin-Färbung (wie für Blut unter Kap. 3.23 beschrieben) auf kontaminierende Zellen untersucht. Die Auszählung ergab einen Anteil von 95% polymorphkernigen Zellen.

3.24.3 Herstellung eines Lysats von neutrophilen Granulozyten für den *Western Blot*

Die Zellsuspension (2×10^5 - 2×10^6 Zellen/ml) wurde in 500µl Lyse-Puffer resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend 10 mal durch eine Spritzenkanüle gesaugt (23G, 0,6mmx25mm), um die genomische DNA zu scheren. Das Zellysat wurde schließlich 10 Minuten bei 10000g, 4°C zentrifugiert und der Überstand portioniert bei -80°C gelagert. Die weitere Vorgehensweise ist unter Kap. 3.13.3 beschrieben.

Reagenzien: Lyse-Puffer: 50mM Tris
150mM NaCl
0,5% Nonidet P40 (Ethylphenylpolyethylenglykol, United States Biochemical)
0,5mM EDTA
75µg/ml PMSF
2µg/ml Aprotinin
0,5µg/ml Leupeptin

3.25 Festphasenimmunoassay (“ELISA”, ”enzyme-linked immunosorbent assay”, [91])

In dieser Arbeit wurde ausschließlich der „direkte ELISA“ zur Quantifizierung von spezifischen Immunglobulinspiegeln angewandt. Hierbei wurde das Antigen auf der Bodenoberfläche einer 96-Napf-Platte immobilisiert. Nach Inkubation mit den Testseren wurde ein Maus-spezifischer alkalische

Phosphatase (AP)-gekoppelter Antikörper zur Detektion mit Substratpuffer verwendet. Die Quantifizierung erfolgte im *ELISA-reader* bei 405nm, der die durch die alkalische Phosphatase katalysierte Umsetzung des im Substratpuffer enthaltenen chromogenen p-Nitrophenylphosphats (pNPP) mißt. Die Versuchsanordnung für die Bestimmung von Antikörperspiegeln in rmPR3-immunisierten Mäusen ist von einem Protokoll abgeleitet, das im Rahmen einer internationalen Studie zur Standardisierung von humanen c-ANCA-Tests entwickelt wurde [133].

Zunächst wurden die Vertiefungen von 96-Napf-Platten (Immulon4HBX, Dynex) mit 50µl Antigen (für rmPR3, pro-rmPR3: 2,5µg/ml) in Beschichtungspuffer über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden dann 3 mal mit Waschpuffer gewaschen und ungesättigte Bindungsstellen mit 200µl pro Napf Inkubationspuffer (eine Stunde RT) blockiert. Die Testseren wurden nach Dekantieren des Inkubationspuffers mit 50µl der in Inkubationspuffer verdünnten Testseren gefüllt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Seren wurden anschließend dekantiert und die Platten 4 mal gewaschen (Inkubationszeit mit Waschpuffer bei jedem Waschschrift: 2 Minuten). Anschließend wurde mit 100µl pro Napf eines AP-gekoppelten Ziege-Anti-Maus-IgG-Antikörpers (Southern Biotechnology Associates), 1:1000 verdünnt in Inkubationspuffer, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden schließlich wie zuvor 4 mal gewaschen und mit 100µl Substratpuffer gefüllt. Die Messung im *ELISA-reader* erfolgt in regelmäßigen Zeitabständen über max. eine Stunde bei 405nm.

Reagenzien: Beschichtungspuffer: 0,01M Natriumcarbonat
0,04M Natriumhydrogencarbonat
0,02% Natriumazid
pH 9,6

Waschpuffer: 0,9% NaCl
0,05% Tween-20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat,
Amersham-Pharmacia)

Inkubationspuffer: 0,14M NaCl
3mM Kaliumchlorid
8mM Dinatriumhydrogenphosphat
1mM Kaliumdihydrogenphosphat
0,1% Natriumazid
0,05% Tween-20
2% BSA
pH 7,4

Substratpuffer: 97mM Diäthanolamin (Sigma)
0,02% Natriumazid
4mM Magnesiumchlorid
10mg/ml p-Nitrophenylphosphat (Sigma); Zugabe unmittelbar
vor der Verwendung
pH 9,8

3.26 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie erlaubt die Detektion von zellspezifischen Oberflächenmolekülen unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Technik sowohl für die Identifikation von Zellen durch Detektion von zellspezifischen

Oberflächenantigenen (z.B. Ly6G, ein neutrophilenspezifisches Antigen [193, 187]) verwendet als auch für funktionelle und immunologische Untersuchungen des im Rahmen dieser Arbeit hergestellten mPR3-/pro-rmPR3-Antiserums.

3.26.1 Durchflußzytometrische Identifikation von neutrophilen Granulozyten

Die zu untersuchende Zellsuspension wurde zunächst in FACS-Puffer resuspendiert (1×10^5 - 5×10^6 Zellen/ml) und pro Färbeansatz 25 μ l in die Vertiefungen einer 96-Napf-Platte vorgelegt. Danach wurde mit 25 μ l eines Biotin-konjugierten Ratte-Anti-Maus-CD11b-Antikörpers (verdünnt 1:200 in FACS-Puffer, Pharmingen) 30 Minuten auf Eis abgedunkelt inkubiert (im Falle einer Einfachfärbung mit Ly6G wurde dieser Schritt nicht durchgeführt). Anschließend wurde 2 mal mit FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation 6 min, 250g, 4°C) und in 25 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 25 μ l eines Gemischs aus Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugiertem Ratte-Anti-Maus-Ly6G-Antikörper (verdünnt 1:100 in FACS-Puffer) und eines Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugats (verdünnt 1:100 in FACS-Puffer; nur bei Doppelfärbung; Pharmingen) wurde weitere 30 Minuten auf Eis abgedunkelt inkubiert, 2 mal gewaschen und schließlich in 100 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Vor der Messung mit einem Durchflußzytometer (FACScan, FACSCalibur, Becton Dickinson) wurden gegebenenfalls 25 μ l des DNA-Farbstoffs Propidiumiodid (1 μ g/ml) und weitere 100 μ l FACS-Puffer zugegeben. Die Auswertung der Fluoreszenzintensität erfolgte mit der Software „CellQuest“ nach Herstellerangaben für FITC bei 530nm, für Phycoerythrin bei 585nm und für den Ausschluß toter Zellen über Fluoreszenz von Propidiumiodid bei 650nm.

Reagenzien: FACS-Puffer: 0,1% BSA
0,1% Natriumazid
in PBS pH7,0

3.26.2 Durchflußzytometrische Detektion von membranständiger PR3 auf partiell stimulierten Neutrophilen

Zunächst wurden peritoneale Neutrophile, wie unter Kap. 3.24 beschrieben, gewonnen und anschließend weitere 2 mal mit PBS gewaschen. Die Zellkonzentration wurde auf 1×10^7 /ml eingestellt und 1ml mit 9ml Percoll-Lösung gemischt. Nach 20-minütiger Ultrazentrifugation (60700g, 4°C) wurde die mittlere Phase abgenommen, 10ml PBS zugegeben, 5 Minuten bei 200g (Raumtemperatur) zentrifugiert, und danach mit 10ml Inkubationspuffer einmal gewaschen und auf 2×10^6 Zellen/ml mit Inkubationspuffer eingestellt. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt: Zur Minimierung unspezifischer IgG-Bindung wurden je 25 μ l Zellsuspension mit 25 μ l Mausserum (1:10 verdünnt) 30 Minuten inkubiert, einmal gewaschen und anschließend für 30 Minuten mit einem nicht konjugierten Ziege-Anti-Maus-IgG-Antikörper (1:100 verdünnt, Southern Biotechnology Associates) inkubiert. Nach 2-maligem Waschen wurde mit einer 1:20-Verdünnung des Anti-rmPR3- bzw. Anti-pro-rmPR3- bzw. Kontrollserums (Kap. 3.21.1) in Inkubationspuffer für eine Stunde inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde mit 25 μ l Inkubationspuffer resuspendiert und mit 25 μ l einer 1:50-Verdünnung eines FITC-konjugierten Ziege-Anti-Maus-IgG-Antikörpers (Southern Biotechnology Associates) für 60 Minuten auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde die Zellsuspension wie in Kap. 3.26.1 beschrieben verdünnt, mit Propidiumiodid gefärbt und im Durchflußzytometer analysiert.

Reagenzien: Inkubationspuffer: 1% BSA
0,1% Natriumazid
in PBS pH7,0

Percoll-Lösung: 9ml Percoll (Amersham-Pharmacia)
1ml 10xPBS, pH 7,2

3.26.3 Quantitative Analyse der Phagozytosekapazität von neutrophilen Granulozyten in Vollblut

Die quantitative Bestimmung der Phagozytoseleistung neutrophiler Granulozyten wurde unter Verwendung von *Phagotest* der Firma Orpegen Pharma, Heidelberg durchgeführt, der alle erforderlichen Reagenzien enthält. Gemessen wird die Aufnahme von FITC-markierten, opsonisierten *E. coli*-Bakterien mittels Durchflußzytometrie [17]. Mit dieser Methode lassen sich Defekte bei Chemotaxis, Adhäsion und Phagozytose detektieren, die Opsonierungsleistung sowie intrazelluläre Vernichtung durch sauerstoffabhängige und sauerstoffunabhängige Mechanismen hingegen werden nicht erfaßt.

Zunächst wurde den zu testenden Mäusen ca. 300µl Blut über die Schwanzvene abgenommen und auf Eis mit verschiedenen Konzentrationen Heparin (s. Ergebnisteil) 10 Minuten inkubiert. Je 100µl Blut wurde mit 20 µl eiskalter Bakteriensuspension (1×10^9 Bakterien/ml) gemischt und 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert; Kontrollansätze wurden parallel auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde danach auf Eis abgestoppt. Um adhärierte, jedoch nicht phagozytierte Bakterien von der späteren Messung auszuschließen, wurde eine Fluoreszenzlöschung („Quenching“) extrazellulärer Bakterien durch Zugabe von 100µl eiskalter „Quenchlösung“ pro Ansatz durchgeführt. Sofort danach wurde 2 mal mit 3ml eiskalter Waschlösung gewaschen (Zentrifugation: 5 Minuten, 250g, 4°C) und die Erythrozyten durch Zugabe von 2ml „lysing solution“ (bei Raumtemperatur) lysiert. Bei Inkubation für 20 Minuten (Raumtemperatur) erfolgt gleichzeitig die Fixierung der Leukozyten durch das in der „lysing solution“ enthaltene Formaldehyd. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert und einmal mit Waschlösung gewaschen (Zentrifugation: 5 Minuten, 250g, 4°C) und nach Zugabe von 200µl „DNA-Färbelösung“ 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Messung am Durchflußzytometer erfolgte innerhalb von 60 Minuten. Bakterienaggregate wurden aufgrund ihres geringeren DNA-Gehaltes von Leukozyten durch Emission des DNA-Farbstoffs bei 650nm unterschieden.

Ausgewertet wurde der prozentuale Anteil der Zellen, die phagozytiert hatten (grün fluoreszierende Zellen) und die Zahl der aufgenommenen Bakterien pro Zelle (Fluoreszenzintensität). Die Granulozytenpopulation wurde über die Vorwärts- und Seitwärtsstreuung („FSC/SSC“-Diagramm) identifiziert.

3.27 Reverse passive Arthus-Reaktion (RPA, [4])

Die lokal induzierte reverse passive Arthus-Reaktion stellt die umgekehrte Form einer Hypersensitivitätsreaktion des Typs III dar. Reaktionen dieses Typs sind durch die Deposition von Antigen-Antikörper-Komplexen in verschiedenen Geweben charakterisiert, die zu einer Komplementaktivierung und einer darauffolgenden Entzündungsreaktion führen. Gewebsläsionen im Entzündungsbereich werden vor allem durch neutrophile Granulozyten hervorgerufen, die über den Komplementrezeptor I an die Immunkomplexe binden und durch Freisetzen verschiedener lytischer Enzyme das umliegende Gewebe schädigen [244]. Bei einer lokalen, kutanen Arthus-Reaktion können die durch die Entzündungsreaktion verursachten Schäden des Blutgefäßsystems anhand von Ödem- und Erythembildung charakterisiert werden. Bei der reversen, passiven Arthus-Reaktion werden Antikörper, die gegen ein irrelevantes Antigen gerichtet sind, lokal vorgelegt, das passende Antigen wird gleichzeitig intravenös verabreicht.

3.27.1 Reverse passive Arthus-Reaktion in der Haut

Den zu testenden Mäusen wurden einen Tag vor Verabreichung des Antigens und der Antikörper beidseitig ventrolateral mit einem handelsüblichen Einmalrasierer (Pronto, Wilkinson) in einem etwa 1,5cm x 1,5cm großen Areal die Fellhaare entfernt. Antikörper und Ovalbumin wurden vor ihrer Verwendung 10 Minuten bei 20000g zentrifugiert, um eventuell in der Lösung entstandene Aggregate zu entfernen.

Den Mäusen wurde auf einer Körperseite im rasierten Areal 50µl einer gereinigten IgG-Fraktion aus Ziege-Anti-Ovalbumin-Serum (2mg/ml, Cappel) intradermal injiziert, auf der gegenüberliegenden Seite erfolgte eine Kontrollinjektion mit PBS oder Kontrollantikörpern (IgG-Fraktion aus normalem Ziegenserum, 2mg/ml, Sigma). Sofort danach erfolgte eine intravenöse Injektion von 20µg pro Gramm Körpergewicht Ovalbumin (Grade V, Sigma) über die Schwanzvene. Bei Experimenten zur Quantifizierung der Ödembildung wurde dem Antigen außerdem 0,1% Evans Blau („Direct Blue 53“, Sigma) zugesetzt. Für Kontrollexperimente wurde den Tieren statt Ovalbumin nur PBS intravenös injiziert.

Der Verlauf der Hämorrhagie wurde 2 bis 6 Stunden nach Antigeninjektion stündlich durch Inspektion der rasierten Areale (einfach blind) verfolgt. Die Entwicklung des Ödems wurde über die Blaufärbung des rasierten Areals quantifiziert. In die Bewertung wurde sowohl Durchmesser als auch Intensität der Hämorrhagie bzw. Blaufärbung einbezogen und mit Werten zwischen 0 (keine Färbung/Purpura) und 4 (sehr starke Färbung/Purpura) angegeben. Eine abschließende Bewertung der Reaktionsstärke wurde an invertierten Hautbiopsien 6 Stunden nach der Antigeninjektion getroffen. Weiterhin wurden die Hautbiopsien histopathologisch untersucht. Das experimentelle Vorgehen zur Herstellung histologischer Hautpräparate ist in Kap. 3.31 beschrieben.

3.27.2 Reverse passive Arthus-Reaktion in der Peritonealhöhle

Vor Verwendung wurden Antikörper und Ovalbumin 10 Minuten bei 20000g zentrifugiert, um eventuell in der Lösung entstandene Aggregate zu entfernen. Den Mäusen wurde schließlich 800µl einer gereinigten IgG-Fraktion aus Ziege-Anti-Ovalbumin-Serum (1mg/ml, Cappel) bzw. eine Kontrollinjektion mit PBS oder Kontrollantikörper (IgG-Fraktion aus normalem Ziegenserum, 2mg/ml, Sigma) intraperitoneal injiziert. Sofort anschließend erfolgte eine intravenöse Injektion von 20µg pro Gramm Körpergewicht Ovalbumin (Grade V, Sigma) über die Schwanzvene. Nach 6 Stunden erfolgte wie in Kap. 3.24.1 beschrieben die Gewinnung von Peritonealexsudat, Lyse von Erythrozyten und quantitative Bestimmung von neutrophilen Granulozyten durch „Diff-Quik“-Färbung und Auszählung sowie mittels Durchflußzytometrie. Zur Bestimmung des TNF α -Spiegels im Peritonealexsudat wurde der durch Zentrifugation (10 Minuten, 250g, 4°C) gewonnene Überstand portioniert und bis zur Messung (Kap. 3.29) bei -80°C gelagert.

3.28 Induktion einer lokalen inflammatorischen Reaktion in der Haut durch

Injektion von TNF α

Eine Reihe von Studien belegt die Rolle von TNF α bei der Ausbildung lokaler Entzündungsreaktionen in der Haut, deren Verlauf einer Schwartzmann Reaktion ähnlich ist [215, 280, 178]. Um den chronischen Verlauf einer inflammatorischen Reaktion in Anwesenheit von c-ANCA experimentell darzustellen, wurde durch die wiederholte, lokale Injektion von TNF α eine leichte dermale Entzündungsreaktion über mehrere Tage aufrechterhalten.

Zunächst wurde den Mäusen einen Tag vor Verabreichung von TNF α und Antikörper-Seren beidseitig ventrolateral mit einem handelsüblichen Einmalrasierer (Pronto, Wilkinson) in einem etwa 1,5cm x 1,5cm großen Areal die Fellhaare entfernt. Am nächsten Tag wurde über die Schwanzvene 100 μ l einer rmPR3-/pro-rmPR3-Antiserumverdünnung (1:2 bzw. 1:4 in PBS) verabreicht. Anschließend wurde über einen Zeitraum von 4 Tagen täglich auf der einen Seite 40 μ l TNF α (die injizierten Dosen sind in Kap. 4.7 angegeben; Roche), auf der anderen Seite 40 μ l PBS/0,1%BSA intradermal appliziert. In einigen Experimenten wurde am fünften Tag nach der ersten Injektion ein zweites Mal intravenös 100 μ l einer rmPR3-/pro-rmPR3-Antiserumverdünnung (1:2 bzw. 1:4 in PBS) verabreicht und die Behandlung weitere 4 Tage fortgeführt. 24 Stunden nach der letzten Injektion wurden von beiden Seiten Hautbiopsien entnommen und histologisch analysiert (Kap. 3.31).

3.29 Quantitative Bestimmung von TNF α

Die quantitative Bestimmung von TNF α -Spiegeln im Peritonealexsudat erfolgte unter Verwendung des „Factor-Test-X Mouse TNF α ELISA Kit“ der Firma Genzyme (Cambridge, USA). Er beruht auf der sog. „sandwich-ELISA“-Technik: Eine mit monoklonalen Anti-Maus-TNF α -Antikörpern beschichtete 96-Napf-Platte bindet zunächst das TNF α der Testflüssigkeit bzw. der TNF α -Standardlösung an den Gefäßboden. Gebundenes TNF α wird durch Zugabe eines Peroxidasegekoppelten polyklonalen Anti-Maus-TNF α -Antikörpers quantifiziert, der an das durch den monoklonalen Antikörper immobilisierte TNF α bindet. Nach erneutem Waschen wird mit Substratlösung inkubiert und die Peroxidase-vermittelte Farbreaktion bei 450nm im *ELISA-reader* quantifiziert. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zunächst wurden 50 μ l Waschpuffer pro Napf vorgelegt und anschließend in Duplikaten 50 μ l der zu analysierenden Peritonealflüssigkeit zugemischt. Für jede Messung wurden parallel folgende Verdünnungen der mitgelieferten TNF α -Standardlösung als Bezugsgröße gemessen: 2240pg/ml, 560pg/ml, 140pg/ml, 35pg/ml und Waschpuffer als Negativkontrolle. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37°C wurde die Platte 4 mal mit Waschpuffer gewaschen und danach mit 100 μ l pro Napf des HRP (*horseradish peroxidase*)-konjugierten Anti-Maus-TNF α -Antikörpers für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde erneut 4 mal gewaschen und anschließend mit 100 μ l pro Napf Substratpuffer gefüllt. Die Farbreaktion wurde nach 10 Minuten durch Zugabe von 100 μ l Stopplösung beendet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des *ELISA-readers* bei 450nm. Die TNF α -Konzentrationen im Peritonealexsudat wurden anhand der Standardwerte ermittelt.

3.30 Transfer von Knochenmarkszellen Ovalbumin-immunisierter NE/PR3-defizienter Mäuse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde alternativ zu der in Kap. 3.22 beschriebenen Methode versucht, mPR3-Antikörper mit Hilfe Antikörper-sezernierender Plasmazellen aus dem Knochenmark immunisierter NE/PR3-defizienter Mäuse auf kongene Wildtypmäuse zu übertragen. Als Kontrollen sollten Knochenmarkszellen von Ovalbumin-immunisierten Mäusen herangezogen werden. Diese Technik erlaubt es, unabhängig von der Präsenz des spezifischen Antigens, Antikörperspiegel in naiven Rezipienten zu erzeugen [199, 200, 284].

3.30.1 Immunisierung von Spendermäusen mit Aluminiumhydroxid-adsorbiertem Ovalbumin

2ml einer 10%-igen $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ -Lösung (Sigma) wurden mit 4,56ml 0,25N NaOH unter ständiger, intensiver Agitation tropfenweise gemischt. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde 10 Minuten bei 1000g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zentrifugat in 50ml H_2O_{dd} gewaschen (Zentrifugation: 10 Minuten 1000g). Das Zentrifugat wurde dann mit 0,9% NaCl auf 2ml Gesamtvolumen resuspendiert und mit 1,2ml einer Ovalbuminlösung (1mg/ml) vermischt. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension 10 Minuten bei 1000g zentrifugiert und der Überstand colorimetrisch (nach Lowry, Kap. 3.15) auf nicht adsorbiertes Ovalbumin geprüft. Wenn der Überstand nicht mehr als 0,05 mg/ml Ovalbumin enthielt, wurde das Zentrifugat in 1,2ml PBS resuspendiert und 100 μ l pro Maus intraperitoneal injiziert. 4 Wochen später wurde in gleicher Weise eine Auffrischungsimmunisierung durchgeführt. Die Antikörperspiegel wurden in Abständen von ca. 4 Wochen analog zu der in Kap. 3.25 beschriebenen Methode untersucht. War kein weiterer Anstieg der Antikörperspiegel mehr zu beobachten, jedoch nicht eher als 3 Monate nach der Auffrischungsimmunisierung, wurde, wie unter Kap. 3.30.2 beschrieben, verfahren.

3.30.2 Isolation von Knochenmarkszellen und Transfer auf naive Mäuse

Die immunisierten Mäuse wurden zunächst getötet und beide Oberschenkelknochen chirurgisch freigelegt. Die Kniekapsel und der Oberschenkelhals wurden mit einer Schere abgetrennt und das Knochenmark mit 5ml komplettem IMDM (*Iscove's modified Dulbecco's medium*) unter Verwendung einer 26G-Kanüle (0,45mmx23mm) herausgespült. Die Zellen wurden dann durch langsames Ansaugen durch eine 23G-Kanüle (0,6mmx30mm) vereinzelt und anschließend 10 Minuten bei 200g zentrifugiert. Anschließend wurden sie 2 mal mit komplettem IMDM gewaschen (Zentrifugation: 10 Minuten 200g) und mit komplettem IMDM auf $2,5 \times 10^7$ Zellen/ml verdünnt. Die Zellen wurden dann mit 50 μ g/ml Mitomycin C (Sigma) 20 Minuten im Begasungsschrank (37°C, 10% CO_2 , Heraeus) inkubiert, 3 mal mit komplettem IMDM gewaschen (Zentrifugation: 10 Minuten 200g) und schließlich in PBS resuspendiert. Es wurden dann zwischen $5,7 \times 10^6$ und $1,2 \times 10^7$ Zellen in 100 μ l PBS intravenös über die Schwanzvene an naive Rezipienten verabreicht. 80 μ l der Zellsuspension wurde außerdem für die Quantifizierung von Anti-Ovalbumin-Immunglobulin-sezernierenden Zellen mittels „ELISPOT“ verwendet, wie unter Kap. 3.30.3 beschrieben.

3.30.3 Quantifizierung spezifischer Immunglobulin-sezernierender Plasmazellen („ELISPOT“, *enzyme linked immunospot assay* [68, 278])

Die „ELISPOT“-Technik bedient sich prinzipiell der gleichen Verfahren wie die „ELISA“-Technik, allerdings werden hier nicht Antikörperspiegel in Lösungen quantifiziert, sondern die Zahl Antikörpersezernierender Plasmazellen in einer Zellsuspension: Ein Gemisch von Zellen wird in einer Antigenbeschichteten 96-Napf-Platte inkubiert und die Plasmazellzahl, nach Waschen und Antikörperdetektion analog zur „ELISA“-Technik, anhand der Zahl der Farbpunkte auf dem Boden der Nöpfe quantifiziert. Eine geeignete Verdünnung der Zellzahl ist hier Voraussetzung, um die sich um die Plasmazellen am Boden der Nöpfe bildenden „Höfe“ hoher Antikörperkonzentrationen eindeutig erkennen zu können.

Beschichtung der 96-Napf-Platte mit Antigen: Eine 96-Napf-Platte mit Nitrozelluloseboden (MAHA N-45, Millipore) wurde über Nacht bei 4°C mit je 100 μ l pro Napf einer Ovalbuminlösung (50 μ g/ml in Beschichtungspuffer) oder Beschichtungspuffer (Negativkontrolle) inkubiert. Anschließend wurde die Platte 3 mal mit PBS gewaschen und mit 100 μ l PBS/5% FCS pro Napf (30 Minuten 37°C) abgesättigt. Anschließend wurde die Lösung dekantiert.

Zellinkubation und Antikörperdetektion: Zunächst wurden, wie unter Kap. 3.30.2 beschrieben, Knochenmarkszellen isoliert und anschließend zwei mal in komplettem IMDM gewaschen (Zentrifugation: 10 Minuten 200g). Jeweils 100µl pro Napf verschiedener Verdünnungen (1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 /ml in komplettem IMDM) wurden über Nacht bei 37°C und 10% CO₂ im Begasungsschrank inkubiert und anschließend 3 mal mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurde jeder Napf mit 100µl einer Verdünnung eines alkalische Phosphatase konjugierten Ziege-Anti-Maus-Ig-Antikörpers (1:800 verdünnt in PBS/0,1%BSA, Southern Biotechnology Associates) bei Raumtemperatur für 3 Stunden inkubiert. Dann wurden die Nöpfe 2 mal mit Waschpuffer und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 50µl Substratlösung pro Napf gestartet und nach ca. 10 Minuten durch Spülen mit Leitungswasser abgestoppt. Die Auswertung erfolgte am nächsten Tag durch Auszählen der Farbpunkte unter dem Mikroskop (Vergrößerung 300-fach, Zeiss). Die Zahl Ovalbumin-spezifischer Immunglobuline sezernierender Plasmazellen wurde aus den durchschnittlichen Zählwerten aller auswertbaren Verdünnungen errechnet (Kap. 4.6.5).

Reagenzien: komplettes IMDM

(*Iscoe's modified Dulbecco's medium*):

IMDM (GibcoBRL)

5% FCS (fötales Kälberserum, inaktiviert für eine Stunde bei 56°C)

2mM L-Glutamin

50µM 2-Mercaptoäthanol

100U/ml Penicillin

100µg/ml Streptomycinsulfat

Beschichtungspuffer:

45,3mM Natriumhydrogencarbonat

18,2mM Natriumcarbonat

pH 9,6

Waschpuffer:

PBS

0,05% Tween-20 (Amersham-Pharmacia)

pH 7,0

Substratpuffer:

(Komponenten sind in

Sigma Fast BCIP/NBT substrate

tablets von Sigma enthalten)

0,15mg/ml BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat)

0,3mg/ml NBT (Nitroblau Tetrazolium)

100mM Tris-HCl

5mM MgCl₂

pH 9,8

3.31 Herstellung von Organ- und Hautpräparaten für histologische Analysen

Die Wegener'sche Granulomatose ist in der generalisierten Phase neben systemischer Vaskulitis auch durch granulomatöse Veränderungen der Lunge und Glomerulonephritis gekennzeichnet. Daher wurde eine histopathologische Untersuchung der Niere, der Lunge und zusätzlich der Leber von mPR3-Antikörper-behandelten Mäusen durchgeführt. Bei lokal induzierten Entzündungsreaktionen in der Haut (Kap. 3.28) wurden außerdem Hautbiopsien der betroffenen Stellen entnommen und histopathologisch untersucht. Ein Teil der Organpräparate wurde im Institut für Pathologie des GSF-

Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Neuherberg (Dr. Leticia Quintanilla-Fend), Hautpräparate wurden an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Technischen Universität München (Beate Heuser) hergestellt. Das pathologische Gutachten wurde von Dr. Fend erstellt. Die Auswertung der histologischen Hautpräparate erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. M. Ollert am Institut für Allergie und Umwelt an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Technischen Universität München. Weiterhin wurden einige Haut- und Organpräparate von der institutseigenen Histologieservicegruppe (Monika Falkenberg) hergestellt.

3.31.1 Organentnahme und Fixierung

Die Mäuse wurden mit Kohlendioxid getötet. Anschließend wurde die Peritonealhöhle und der Brustkorb chirurgisch geöffnet. Entnommen wurden die gesamte Leber, beide Nieren und beide Lungenflügel. Eine Leberhälfte bzw. eine der beiden Nieren und Lungenflügel wurden dann in ca. 2-5mm große Stücke geschnitten und in 4% Paraformaldehyd/PBS mindestens 24 Stunden bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Organe in Intervallen von 24 Stunden 2 mal in frisches PBS überführt und bei 4°C gelagert. Der andere Teil der Organe wurde ebenfalls zerkleinert, in Kryoröhren (Nunc) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Mit Hautbiopsien wurde auf die gleiche Weise verfahren.

3.31.2 Herstellung von Gefrierschnitten

Zunächst wurden Glasobjektträger (Menzel) mit Gelatine beschichtet, um eine zuverlässige Anheftung des geschnittenen Materials zu gewährleisten. Hierzu wurde Gelatine in H₂O_d bei 60°C gelöst (Konzentration: 0,5%), wenige Körnchen kristallines KCr(SO₄)₂ (Merck) zugegeben und die Objektträger kurz eingetaucht. Anschließend wurden die Objektträger abgetropft und bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Organe wurden mit „Tissue Tek“ (Blossom) auf den Halteblock des auf -18°C vorgekühlten Kryostaten aufgebracht und in Scheiben mit 18µm Dicke geschnitten. Die Organschnitte wurden mit einem Pinsel auf den Objektträger überführt und bei Raumtemperatur getrocknet.

3.31.3 Färbung von Gefrierschnitten mit Hämalaun/Eosin

Die Präparate wurden kurz gewässert und anschließend für 10-60 Minuten in saure Hämalaunlösung überführt. Anschließend wurden die Schnitte zwei mal eine Minute in Leitungswasser gebläut und danach 1-10 Minuten in Eosinlösung gefärbt. Die Präparate wurden danach eine Minute in 70% Äthanol, Äthanol abs. und schließlich zwei mal in Xylol überführt und in „Entellan“ (Merck) für die Mikroskopie eingedeckt.

| | | |
|--------------------|-----------------------|---|
| <u>Reagenzien:</u> | saure Hämalaunlösung: | 0,1% Hämatoxylin 0,02% Natriumjodat 5% Kalialaun nach Auflösen der kristallinen Komponenten Zugabe von 5% Chloralhydrat 0,1% Zitronensäure |
| | Eosinlösung: | 1% Eosin in 96% Äthanol |

3.32 Detektion von Anti-Neutrophilen-Antikörpern mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenzfärbung [345]

Die Methode der indirekten Immunfluoreszenzfärbung von Äthanol-fixierten neutrophilen Granulozyten wird in Kombination mit einem Festphasenimmunoassay (ELISA) als diagnostisches Kriterium für die Wegener'sche Granulomatose eingesetzt [345, 250]. In der vorliegenden Arbeit wurden Formaldehyd-fixierte Granulozyten bevorzugt, da diese Methode eine bessere Darstellung der primären Granula erlaubt. Weiterhin war keine Differenzierung zwischen verschiedenen ANCA-Klassen (c-ANCA, p-ANCA) erforderlichlich.

Zunächst wurde bei einer WT- und einer PR3/NE-defizienten Maus eine Casein-vermittelte Peritonitis induziert und anschließend wurden die infiltrierenden Zellen isoliert (Kap. 3.24.1). Die Zellen wurden in 50µl PBS resuspendiert und je 0,5µl davon auf einen Glasobjektträger aufgebracht. Die Zellsuspension wurde mit einer Pipettenspitze auf dem Objektträger punktförmig auf ein Areal von ca. 1cm verteilt und bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Die Zellen wurden dann in 4% Paraformaldehyd/PBS für 5 Minuten auf Eis fixiert, danach kurz in PBS gewaschen und schließlich luftgetrocknet. Die Lagerung erfolgte bei 4°C für maximal eine Woche bis zur Antikörperinkubation. Vor der Antiseruminkubation wurden die Zellen für 10 Minuten mit 0,05% Triton X-100/PBS permeabilisiert und anschließend 3 mal 2 Minuten in PBS gewaschen. Dann wurden je 30µl pro Ausstrich des zu testenden Serums geeigneter Verdünnung (Kap. 4.6.2) aufgetragen und bei Raumtemperatur für 30 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Objektträger wurden danach 2 mal für je 5 Minuten in PBS gewaschen und schließlich für 30 Minuten mit einer 1:200-Verdünnung eines Cy3-konjugierten Ziege-Anti-Maus-IgG-Antikörpers (Jackson ImmunoResearch) in einer feuchten Kammer inkubiert. Schließlich wurden die Präparate 2 mal für 5 Minuten in PBS gewaschen und danach in Mowiol eingedeckt. Die Auswertung erfolgte am Immunfluoreszenzmikroskop (Zeiss) unter Verwendung eines 450-490 nm-Emissionsfilters.

Reagenzien: Mowiol: 50ml Glycerin AR (Merck)
2,4g Mowiol (Polyvinylalkohol 4-88, Fluka)
6ml H₂O_d, gemischt und bei RT 2 Stunden inkubiert
12ml 0,2M Tris-HCl pH 8,5 zugegeben, bei 53°C gelöst
Zentrifugation (5000g, 20min), Überstand portioniert
bei -20°C gelagert

3.33 Quantitative Bestimmung des Aktivierungszustandes neutrophiler Granulozyten

Eine wichtige Eigenschaft von Anti-Neutrophilen-Antikörpern ist die Fähigkeit, Zytokin-stimulierte neutrophile Granulozyten zu aktivieren [96]. Ein wichtiger, meßbarer Parameter dieses Aktivierungsprozesses ist die Freisetzung reaktiver Sauerstoffintermediate („ROI“, *reactive oxygen intermediates*). Die intrazelluläre Synthese der ROI kann unter Verwendung von Dihydrorhodamin als fluorogenes Substrat durch Flußzytometrie bestimmt werden: Die passiv von den neutrophilen Granulozyten aufgenommenen Dihydrorhodamin-Moleküle werden unter dem Einfluß von Sauerstoffradikalen zu fluoreszierendem Rhodamin oxidiert. Die daraus resultierende Fluoreszenzintensität spiegelt den Aktivierungsstatus wieder [89, 261].

Freigesetzte O₂⁻-Moleküle lassen sich durch die Reduktion von Ferrizytochrom C (Fe³⁺) zu Ferrozytochrom C (Fe²⁺) quantifizieren. Dabei wird vom Superoxidmolekül ein Elektron auf Zytochrom C übertragen, das dadurch sein Absorptionsmaximum verändert. Aus der Zunahme der

Absorption bei 550nm läßt sich so die Konzentration von Superoxidmolekülen im Medium bestimmen. Da andere Reduktanten im Medium zur Zytochrom C-Reduktion beitragen können, wird parallel ein Referenzexperiment mit Superoxiddismutase (SOD) durchgeführt. SOD katalysiert die Umsetzung von Superoxid zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff. Diese Kontrolle korrigiert die Effekte anderer Reduktanten, indem die Werte der Referenz von den gemessenen Werten des Versuchs subtrahiert werden.

3.33.1 Quantitative Bestimmung intrazellulärer, oxidativer Sauerstoffverbindungen

Da in der Regel 0,5-1ml Blut nötig waren, wurden WT- bzw. NE/PR3-defiziente Mäuse ausgeblutet und das Blut sofort auf Eis mit einer Heparinlösung gemischt (20U Heparin/ml Blut; Sigma). Zur Anreicherung von Granulozyten und Depletion von Erythrozyten wurde das heparinisierte Blut dann mit gleichem Volumen PBS/3%Dextran T-500 (Amersham-Pharmacia) gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert [35]. Die Plasmaphase wurde abgenommen und 10 Minuten bei 235g zentrifugiert. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen (8 min Zentrifugation bei 235g) und in 250µl PBS resuspendiert. Nach 5-minütiger Abkühlung auf Eis wurden die Zellen mit 2,5ml eiskalter 0,2x PBS verdünnt, 30 Sekunden auf Eis inkubiert und anschließend die Isotonizität durch Zugabe von 2,5ml kalter 1,8xPBS wiederhergestellt. Nach zweimaligem Waschen mit eiskalter PBS (10 min Zentrifugation bei 250g, 4°C) wurde die Zellsuspension mit PBSG auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt und in 130µl-Portionen verteilt. Jeder Ansatz wurde für genau 15 Minuten bei 37°C mit 2ng/ml TNF α (Roche) inkubiert und sofort anschließend wurde 1,3µl 200µM Dihydrorhodamin 123 (2mM Stocklösung in PBS vorverdünnt; Molecular Probes) dazugemischt und 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde 2,6µl Serum (Anti-rmPR3, Anti-pro-rmPR3, Kontrollserum) dazugemischt. Es wurden vor Serumzugabe und danach alle 30 Minuten 25µl-Proben entnommen, in 150µl eiskalter PBS/0,1% BSA verdünnt und sofort flußzytometrisch bei 530nm Emissionswellenlänge analysiert.

3.33.2 Quantitative Bestimmung freigesetzten Superoxids [206]

Zunächst wurden wie unter Kap. 3.24 und 3.26.2 beschrieben, stimulierte Peritonealgranulozyten gewonnen. Die Zellsuspension wurde auf 1×10^6 /ml eingestellt. In einer 96-Napf-Platte wurde jeweils in Duplikaten vorgelegt: 140,8µl PBSG, 10µl 1,5mM Zytochrom C (in PBSG, Sigma), 4 µl SOD (3mg/ml in H₂O, Sigma), 40µl Zellsuspension. Nach 5 Minuten Inkubation bei 37°C wurde 5,2µl PMA (8µg/ml) als Positivkontrolle oder Testserum/TNF α (Serumverdünnung 2,5-fach in 200ng/ml TNF α) zugegeben. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die optische Dichte bei 550nm im *ELISA-reader* gemessen und dazwischen unter leichtem Schwenken bei 37°C inkubiert.

Reagenzien: PBSG: 0,9mM Calciumchlorid
0,5mM Magnesiumchlorid
7,5mM Glukose
in PBS pH 7,2

3.34 Statistische Auswertung

Experimentelle Daten wurden auf ihre statistische Signifikanz unter Verwendung des Mann-Whitney U-Tests überprüft. Die Berechnung des U-Wertes der einzelnen Stichprobenserien erfolgte nach der Formel:

$$U_1 = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - \sum R_1$$

$$U_2 = n_1 n_2 + \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} - \sum R_2$$

mit n_x = Stichprobengröße der Serie x und R_x = Ränge der Stichprobenserie x .

Die Nullhypothese (d. h. beide Stichprobenserien sind wahrscheinlich nicht verschieden) wurde bei $p \leq 0,05$ verworfen. Eine Transformation auf Wahrscheinlichkeiten erfolgte unter Verwendung des Programms WinSTAT (R. Fitch Software). Für die Berechnung des Wertes p wurde eine zweiseitige Verteilung angenommen.

4 Ergebnisse

Die pathologischen Mechanismen der Wegener'schen Granulomatose (WG) konnten bis heute nicht vollständig aufgeklärt werden. Das folgende von Gross und Mitarbeitern [126] entwickelte und allgemein anerkannte Modell ist im wesentlichen auf *in vitro*-Befunde gestützt: Zunächst lösen bakterielle Infekte eine zytokinvermittelte Stimulierung neutrophiler Granulozyten aus, was zu einer verstärkten Oberflächenexpression von ANCA-Antigenen auf Neutrophilen und Zelladhäsionsmolekülen auf den Granulozyten und Endothelzellen führt. C-ANCA binden an die nun auf der Oberfläche der Zellen befindliche PR3 und lösen eine F_c-Rezeptor-vermittelte Aktivierung der neutrophilen Granulozyten aus. Dies führt zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffverbindungen („ROS“) und lysosomalen Proteinen und schließlich zu Vaskulitis. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zum einen untersucht, welche Auswirkungen eine Defizienz der Neutrophilen-Enzyme PR3 und NE auf die Entwicklung von Entzündungsreaktionen und die Funktion von Neutrophilen der Maus hat. Zum anderen wurde versucht, die pathogene Wirkung von c-ANCA im Mausmodell zu beweisen.

4.1 Phänotypische Charakterisierung PR3/NE-defizienter Mäuse

Nach dem in Kap. 1.4 beschriebenen Modell ist PR3 nicht nur als Autoantigen an der Pathogenese der Wegener'schen Granulomatose beteiligt, sondern trägt auch gemeinsam mit Neutrophilen-Elastase und anderen lysosomalen Enzymen durch seine proteolytische Aktivität zur Schädigung von Gefäßen und Organen bei [285, 160, 8]. Weiterhin belegen zahlreiche Arbeiten die Modulation inflammatorischer Reaktionen durch beide Serinproteasen [192, 229, 259, 66, 255, 12, 13, 58]. Mäuse vom Wildtyp sind von kongenen PR3/NE-defizienten Mäusen hinsichtlich Entwicklung, Verhalten, Fertilität und Infektanfälligkeit nicht zu unterscheiden [105]. In der vorliegenden Arbeit konnte aber an PR3/NE-defizienten Mäusen gezeigt werden, daß beide oder eine der beiden Serinproteasen bei der Entwicklung einer experimentell erzeugten lokalen reversen passiven Arthus-Reaktion beteiligt sind. Im folgenden wurden außerdem PR3/NE-defiziente Mäuse hinsichtlich Neutrophilenzahl in peripherem Blut und Phagozytoseleistung von Neutrophilen untersucht.

4.1.1 Bestimmung der Anzahl von neutrophilen Granulozyten in peripherem Blut

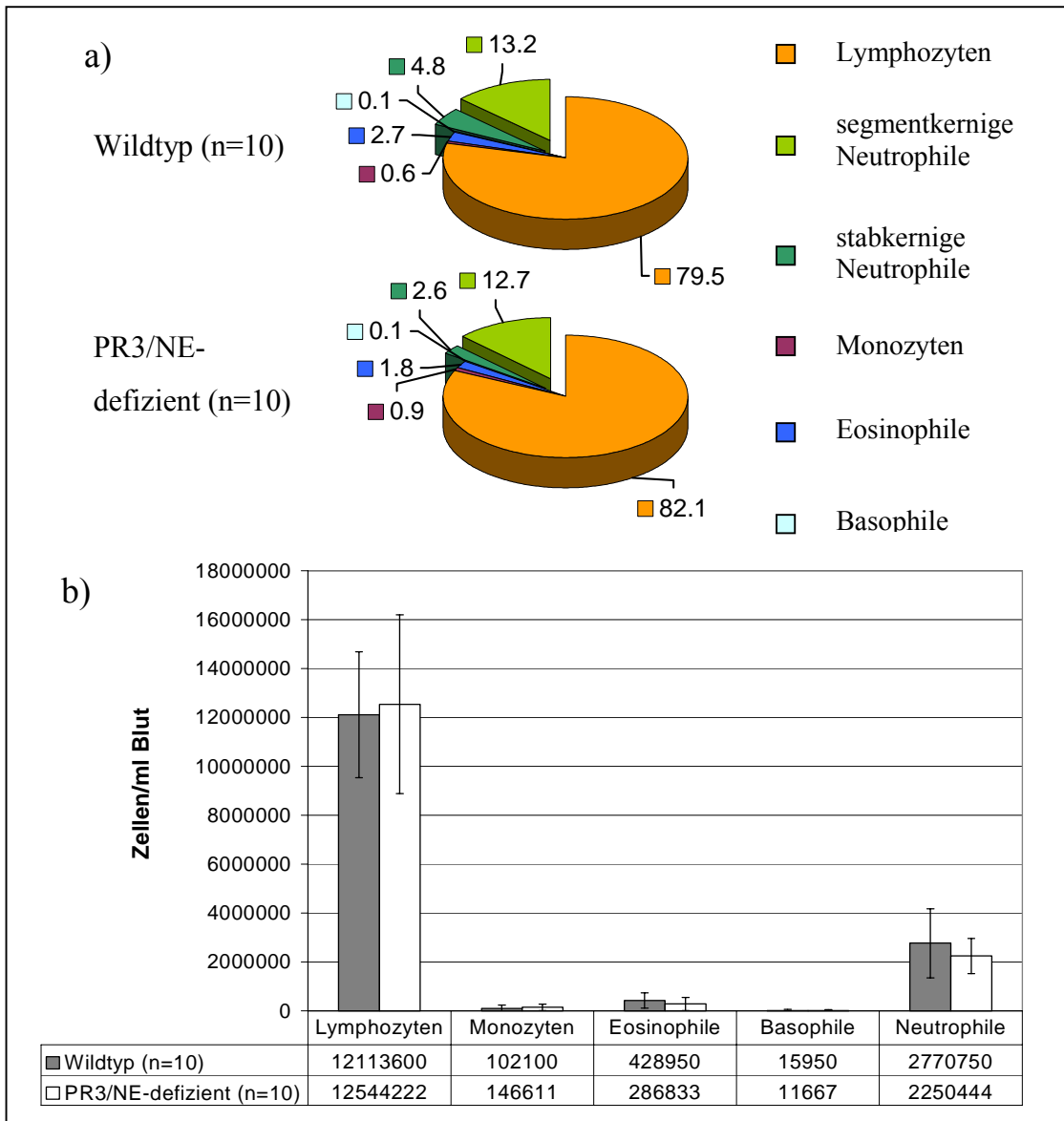


Abb. 4.1: Die Anzahl der verschiedenen Zelltypen in der Leukozytenpopulation unterscheidet sich zwischen WT- und PR3/NE-defizienten Mäusen nicht.

a) Differentialblutbild: In einem zufällig gewählten Bereich von jeweils 10 „Diff-Quik“-gefärbten Blutaussstrichen von WT- und PR3/NE-defizienten Mäusen wurden 100 Zellen gezählt. Die unterschiedlichen Zelltypen wurden morphologisch und anhand ihres Färbemusters bestimmt. Die Neutrophilenzahlen lagen für Blutproben des Wildtyps zwischen 5% und 27%, für PR3/NE-defiziente Proben zwischen 8% und 23%. Alle Angaben sind Durchschnittswerte in %.

b) Im Hämozytometer wurde die Leukozytenzellzahl pro Milliliter Blut bestimmt und die Zahl der verschiedenen Zelltypen pro Volumeneinheit aus a) errechnet. Die Zahlenwerte unterhalb der Grafiken geben die Durchschnittswerte von jeweils 10 analysierten Blutproben wieder. Vertikale Balken zeigen die Standardabweichung der erhaltenen Werte an. Unterschiede zwischen PR3/NE-defizienten und Blutproben des Wildtyps sind hinsichtlich der Neutrophilenzahl statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney U-Test: Differentialblutbild segmentkernige Neutrophile: $p=0,806$, stabkernige Neutrophile: $p=0,063$. Neutrophile/ml Blut: $p=0,288$).

Studien mit humanen Leukämie-Zelllinien zufolge spielt PR3 nicht nur im „angeborenen Immunsystem“ eine wichtige Rolle, sondern ist auch an der Proliferationsregulation granulopoietischer Vorläuferzellen beteiligt [31, 291, 283]. Weiterhin ist beim Menschen die erbliche zyklische Neutropenie mit einem monoallelischen Defekt des Neutrophilen-Elastase-Gens (Ela2) assoziiert [149]. Um diese Befunde hinsichtlich der Entwicklung neutrophiler Granulozyten in der Maus zu überprüfen, wurde die Anzahl neutrophiler Granulozyten in peripherem Blut PR3/NE-defizienter Mäuse mit kongenen Wildtyp-Tieren verglichen. Hierzu wurde das Differentialblutbild von insgesamt 10 WT- und 10 PR3/NE-defizienten Mäusen im Alter von 2 bis 5 Monaten an Hämatoxylin/Eosin-gefärbten Blutaussstrichen untersucht und aus den gewonnenen Daten und der Zellzählung im Hämozytometer die Anzahl der einzelnen Zellen pro Volumeneinheit errechnet. Es wurden keine signifikanten Unterschiede der relativen und absoluten Zellzahlen zwischen WT- und PR3/NE-defizienten Leukozyten gefunden (Abb. 4.1). Die Ergebnisse des Differentialblutbildes wurden weiterhin durch fluoreszenzzytometrische Identifikation neutrophiler Granulozyten über Myeloid- und Neutrophilen-spezifische Oberflächenmoleküle (*Mac1/Ly6G*-Doppelfärbung) bestätigt (nicht gezeigt).

Offensichtlich hat die PR3/NE-Defizienz auf die Zahl neutrophiler Granulozyten im peripheren Blut keinen Einfluß. Darüberhinaus ließen sich keine morphologischen Anomalien PR3/NE-defizienter Granulozyten im Lichtmikroskop erkennen (nicht gezeigt).

4.2 Vergleichende, quantitative Bestimmung der Phagozytoseleistung neutrophiler Granulozyten von Wildtyp- und PR3/NE-defizienten Mäusen

Der Phagozytoseprozeß kann in mehrere Phasen eingeteilt werden: Chemotaxis, Anlagerung von Partikeln an die Zelloberfläche, Phagozytose und Vernichtung von Bakterien durch sauerstoffabhängige und sauerstoffunabhängige Mechanismen. Das pleiotrope biologische Wirkungsspektrum der beiden Serinproteasen PR3 und NE erschwert die Analyse der einem Phänotyp zugrunde liegenden funktionellen Defekte bei PR3/NE-defizienten Mäusen *in vivo*. Denkbar ist sowohl ein Einfluß auf die extravasale Zellmigration durch lokale Proteolyse extrazellulärer Matrixproteine als auch die Modulation von Chemotaxis und Aktivierung von Neutrophilen und Monozyten (Kap. 1.5).

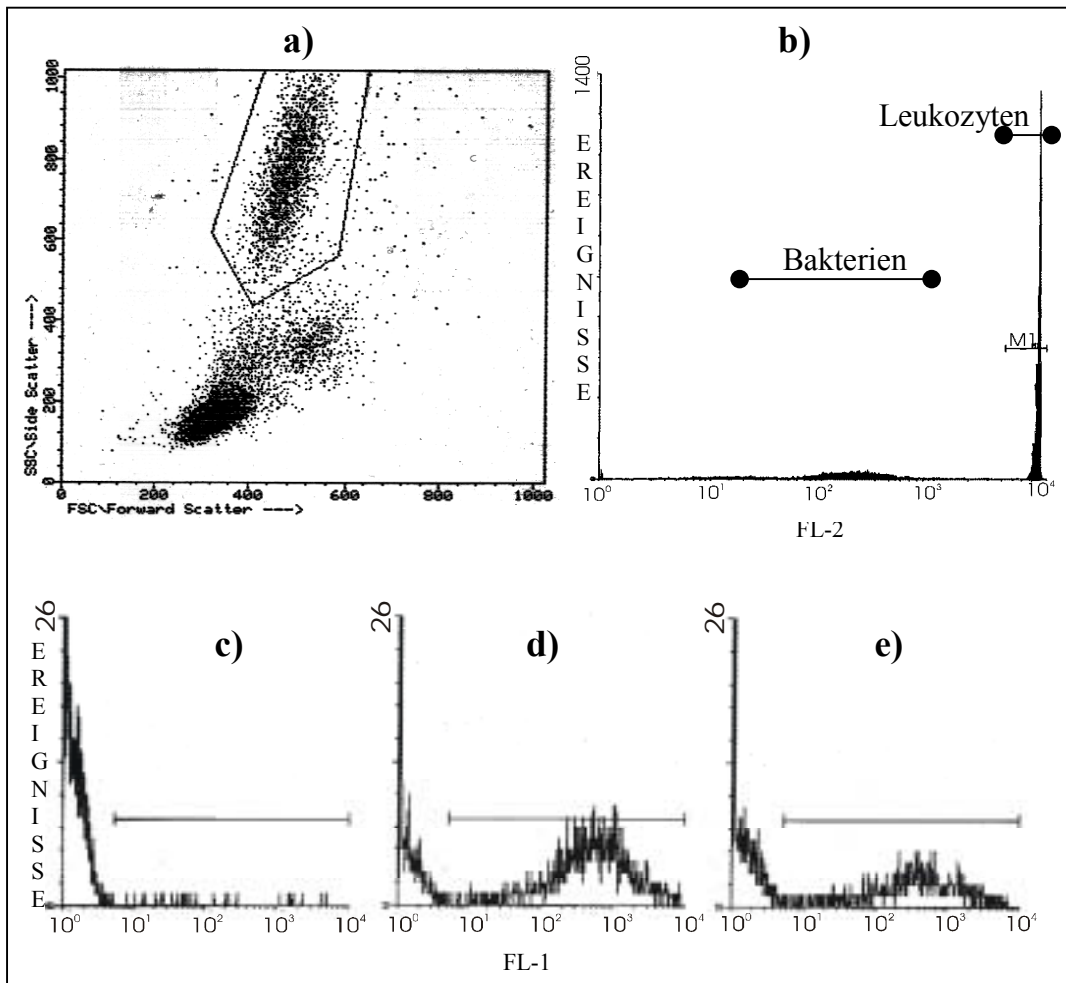


Abb. 4.2: Datenerhebungsmethode zur fluoreszenzzytometrischen Bestimmung der Phagozytosekapazität neutrophiler Granulozyten.

Beispiel einer vergleichenden Messung von Blutproben einer WT- und einer PR3/NE-defizienten Maus (2000U/ml Heparin; Durchschnittswerte s. Tab. 4.1).

- a) Im Streulichtdiagramm lassen sich Granulozyten (Kasten) anhand ihrer Größe (Parameter auf der x-Achse „FSC“, Vorwärtsstreulicht) und ihrer Granularität (Parameter auf der y-Achse „SSC“, Seitwärtsstreulicht) innerhalb der Leukozytenpopulation identifizieren.
- b) Um Bakterienaggregate von der Datenerhebung auszuschließen, wurden die Zellen mit DNA-Farbstoff angefärbt. Anhand ihres höheren DNA-Gehaltes (rote Fluoreszenz; „FL-2“) lassen sich die Leukozyten von Bakterien unterscheiden.

Die Bestimmung der Phagozytoseaktivität erfolgte nur für die Zellen, die beide Kriterien erfüllten (Streulichtcharakteristik wie im markierten Bereich in a) und DNA-Gehalt wie im markierten Bereich („M1“) in b)

- c) Negativkontrolle: die Probe wurde bei 0°C bis zur Messung gelagert; der Grünfluoreszenzparameter („FL-1“) wurde so eingestellt, daß max. 5% der Zellen im positiven Bereich (horizontaler Balken) lagen
- d) Bestimmung der Phagozytoseaktivität von Wildtyp-Granulozyten
- e) Bestimmung der Phagozytoseaktivität von PR3/NE-defizienten Granulozyten

Anhand der Negativkontrolle wurde zunächst der Schwellenwert (grüne Fluoreszenz; „FL-1“=8) für Phagozytoseaktivität festgelegt (horizontaler Balken). Die im markierten Bereich liegenden Zellen wurden als aktiv phagozytierend bewertet und der prozentuale Anteil zu nicht phagozytierenden Zellen („FL-1“<8) bestimmt.

Mit Hilfe der fluoreszenzzytometrischen Quantifizierung der Phagozytoseaktivität läßt sich gezielt untersuchen, ob quantitative Unterschiede bei der Chemotaxis und Aktivierung existieren, die unabhängig von der Wechselwirkung von Neutrophilen, Endothelzellen und extrazellulärer Matrix sind. Hierzu wurde die Aufnahme fluoreszenzfarbstoffmarkierter Bakterien in heparinisiertem Vollblut fluoreszenzzytometrisch gemessen (Abb. 4.2). Um Oponisierungsunterschiede auszuschließen, wurden mit gepooltem Serum bereits voropsonisierte Bakterien verwendet. Da die Phagozytosekinetik von dem Verhältnis Leukozyten zu Bakterien bestimmt wird, wurden Bakterien in 10-fachem Überschuß eingesetzt. Gemäß der Arbeitsanweisung des Herstellers der Reagenzien („Arbeitsanweisung Phagotest“ Version 7/96, Orpegen Pharma, Heidelberg) werden nach 10 Minuten bei ca. 75% aller neutrophilen Granulozyten Aufnahme von Bakterien beobachtet. Dieser Wert erhöht sich bei weiterer Inkubation nur noch schwach. Diese Werte wurden mit humanem Blut bestimmt. Da der Anteil neutrophiler Granulozyten in der Leukozytenpopulation der Maus nur ca. 20% beträgt (beim Menschen ca. 60%; Kap. 4.1.1), wurde im hier beschriebenen Experiment die Inkubationszeit von 10 Minuten (für humane Zellen) auf 30-50 Minuten verlängert.

PR3/NE-defizienten Mäusen und kongenen Wildtyp-Tieren wurde aus der Schwanzvene Blut entnommen und dieses mit unterschiedlichen Konzentrationen Heparin versetzt. Anschließend wurde es mit FITC-markierten *E. coli* 30-50 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend die Fluoreszenzintensität von neutrophilen Granulozyten bestimmt.

Während in den Ansätzen mit 36-80 U/ml Heparin nach 30-minütiger Inkubation kein signifikanter Unterschied zwischen PR3/NE-defizienten und Wildtyp-Zellen zu detektieren war, wurden bei Konzentrationen ab 2000U/ml nach 50 Minuten Inkubation deutlich weniger phagozytierende PR3/NE-defiziente Granulozyten als WT-Granulozyten beobachtet (Tab. 4.1). Mit steigender Heparinkonzentration (50 Minuten Inkubation) verringerte sich der Anteil phagozytierender Granulozyten beider Genotypen. Während jedoch bei 6000U/ml Heparin die Phagozytose PR3/NE-defizienter Zellen nahezu vollständig blockiert war, waren etwa die Hälfte der WT-Granulozyten weiterhin phagozytotisch aktiv. Signifikante Unterschiede bei der Anzahl aufgenommener Bakterien phagozytotisch aktiver Graulozyten (dargestellt durch die Fluoreszenzintensität) wurden dagegen nicht beobachtet.

| Genotyp (Anzahl der getesteten Mäuse) | Anteil phagozytierender Granulozyten [%] (Standardabweichung) | Fluoreszenzintensität phagozytierender Granulozyten (Standardabweichung) | Heparin- konzentration [U/ml] |
|---|---|---|-------------------------------------|
| Wildtyp (3) | 83,4 (14,5) | 651,4 (199,1) | 36 |
| PR3/NE-defizient (3) | 85,4 (8,1) | 700,6 (83,1) | |
| Wildtyp (3) | 79,4 (12,9) | 636,3 (178,3) | 80 |
| PR3/NE-defizient (2) | 81,2 (13,4) | 791,3 (56,1) | |
| Wildtyp (7) | 83,4 (4,5) | 1039,2 (313,1) | 2000 |
| PR3/NE-defizient (7) | 49,9 (13,5) | 1150,2 (209,8) | |
| Wildtyp (2) | 88,05 (5) | 887 (59,5) | 2500 |
| PR3/NE-defizient (2) | 35,85 (28,1) | 548,8 (341) | |
| Wildtyp (2) | 40,7 (10,8) | 2467,9 (928) | 4000 |
| PR3/NE-defizient (2) | 4,4 (6,1) | * | |
| Wildtyp (2) | 51,2 (6,2) | 1419,3 (127,3) | 6000 |
| PR3/NE-defizient (2) | 0,6 (0,8) | * | |

Tab. 4.1: Quantitativer Vergleich der Phagozytosekapazität *in vitro* von Granulozyten PR3/NE-defizienter Mäuse und kongener Wildtyp-Tiere in Vollblut.

Der prozentuale Anteil phagozytierender Granulozyten nimmt mit steigender Heparinkonzentration bei beiden Mausstämmen ab. Der Anteil phagozytierender Granulozyten ist bei Konzentrationen ab 2000U/ml bei PR3/NE-defizienten Mäusen jedoch deutlich geringer als bei kongenen Wildtyp-Tieren. Statistisch signifikante Unterschiede der mittleren Fluoreszenzintensität (proportional zur Anzahl aufgenommener FITC-markierter Bakterien pro Zelle) waren zwischen den beiden Genotypen nicht zu beobachten (Mann-Whitney U-Test: $p=0,827$ bei 36U/ml Heparin, $p=0,277$ bei 2000U/ml Heparin). Wegen der unterschiedlichen Phagozytoseaktivitäten wurden die Meßwerte bei niedrigen Heparinkonzentrationen (36-80U/ml) nach 30 Minuten Inkubation erhoben, ab 2000U/ml wurde 50 Minuten inkubiert.

* Eine Auswertung ist aufgrund der niedrigen Zahl phagozytierender Zellen nicht möglich.

Angaben in Klammern der linken Spalte bezeichnen die Anzahl der getesteten Blutproben. Angaben der beiden mittleren Spalten stellen Mittelwerte der erhaltenen Daten dar (eingeklammerte Werte bezeichnen deren Standardabweichung). Die Unterschiede der Anteile phagozytierender Granulozyten bei 36U/ml sind statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney U-Test: $p=0,827$), bei hohen Heparinkonzentrationen ist der Unterschied hingegen signifikant (Mann-Whitney U-Test: $p=0,0017$ bei 2000U/ml Heparin).

4.3 Reverse, passive Arthus-Reaktion

Die Arthus-Reaktion ist ein klassisches *in vivo*-Modell für Immunkomplex-vermittelte akute inflammatorische Gewebeschädigungen [4]. In der reversen, passiven Arthus-Reaktion (RPA) wird lokal ein Überschuß an Antikörpern vorgelegt und das entsprechende Antigen intravenös verabreicht. Auf die Haut angewandt, gewährleistet diese Vorgehensweise perivaskuläre Deposition von Immunkomplexen in der Dermis und löst eine rasche inflammatorische Antwort aus. Sie ist gekennzeichnet durch Ödembildung, Neutrophilen-Akkumulation, Hämorrhagie und schließlich Gewebenekrose. Neuere experimentelle Ergebnisse legen nahe, daß die inflammatorische Kaskade in der intradermalen RPA durch F_c-Rezeptor-vermittelte Aktivierung von Mastzellen ausgelöst wird [304, 305] und durch Aktivierung der Komplementkaskade über den klassischen Weg verstärkt wird [244]. Neben F_c-Rezeptor-vermittelter Aktivierung von Mastzellen und Komplementaktivierung kann eine Arthus-Reaktion auch über einen dritten Weg induziert werden: Eine Immunkomplexperitonitis wird vorwiegend über F_c-Rezeptor-vermittelte Aktivierung von Makrophagen ausgelöst [142].

Eine Immunkomplexperitonitis ist immer von einem transienten systemischen und lokalen Anstieg des TNF α -Spiegels begleitet. Es existieren aber widersprüchliche experimentelle Daten bezüglich einer TNF α -vermittelten Rekrutierung von Neutrophilen [351, 142]. Von Zhang und Mitarbeitern wurde bereits 5 Minuten nach der Deposition von Antikörpern in der Peritonealhöhle ein rascher Anstieg des TNF α -Spiegels in derselben beobachtet, der nach weiteren 5 Minuten wieder abfiel. Ein zweiter, wesentlich stärkerer Anstieg wurde schließlich nach 6 Stunden beobachtet. Bei Mastzell-defizienten Mäusen wurde der erste Anstieg nicht beobachtet und der zweite war wesentlich schwächer ausgeprägt als bei WT-Tieren. Die Autoren schlußfolgerten, daß der zweite Anstieg des TNF α -Spiegels durch infiltrierende neutrophile Granulozyten hervorgerufen wird. Dieser Befund erschien im Hinblick auf die Fähigkeit von PR3, membrangebundenes TNF α zu spalten, besonders wichtig [259, 58].

PR3/NE-defiziente Mäuse boten sich daher in idealer Weise an, um die Beteiligung der beiden Serinproteasen an der Entwicklung einer Immunkomplex-vermittelten Immunreaktion *in vivo* zu untersuchen.

4.3.1 Reverse, passive Arthus-Reaktion in der Haut

Wie von Fröhlich bereits gezeigt wurde, lassen sich in Hautbiopsien von WT-Mäusen 8 Stunden nach der Induktion einer dermalen Arthus-Reaktion dichte Infiltrate von polymorphonukleären Zellen an der betroffenen Stelle nachweisen [105]. Während bei heterozygoten PR3/NE-defizienten Mäusen

schon deutlich weniger infiltrierende Zellen zu beobachten waren, wurden bei homozygoten Tieren interstitiell kaum polymorphonukleäre Zellen gefunden.

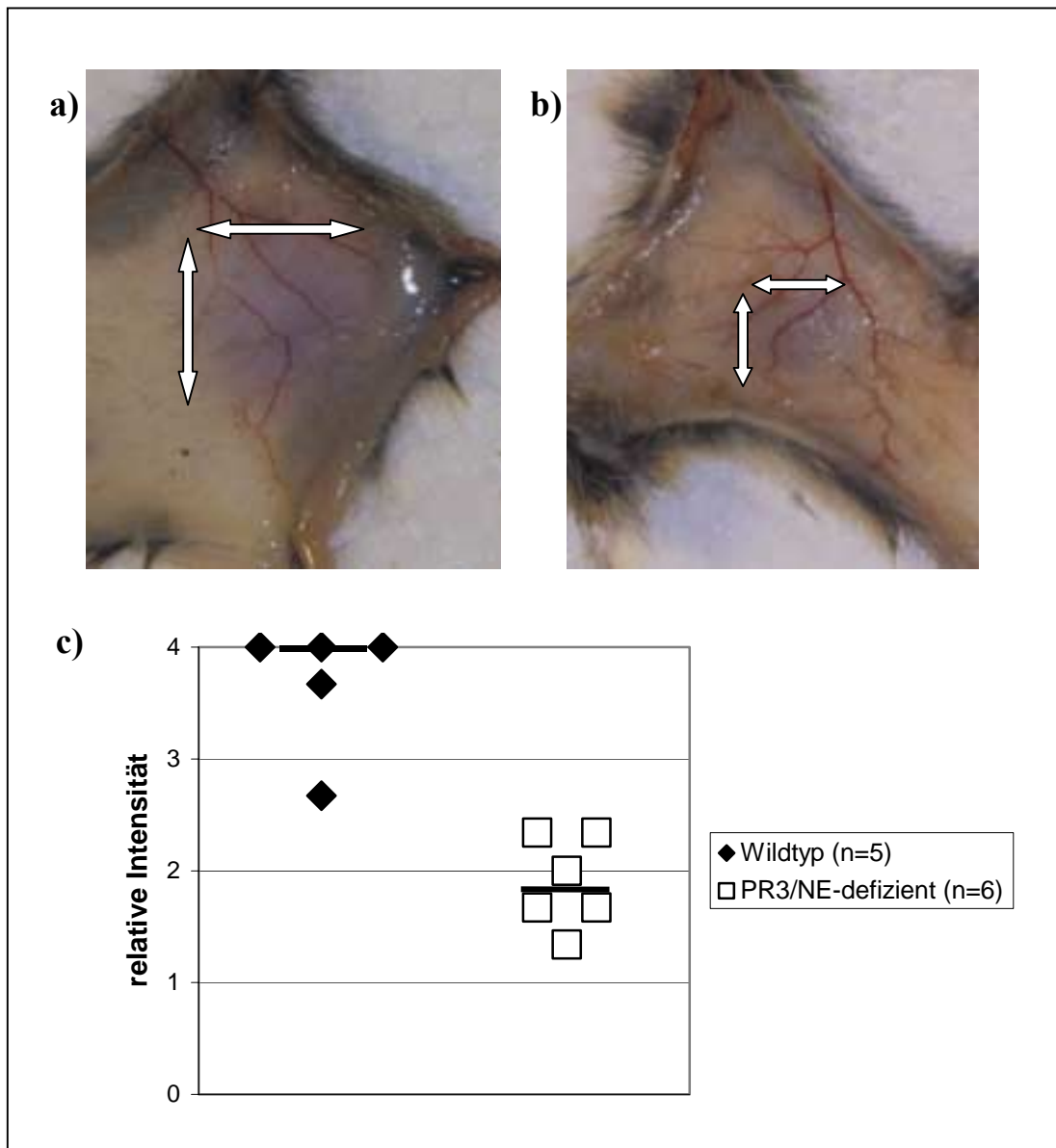


Abb. 4.3: Quantifizierung der lokalen Ödeme 60 Minuten nach einer experimentell induzierten dermalen reversen passiven Arthus-Reaktion.

- a) Unterseite des Hautareals einer WT-Maus
- b) Unterseite des Hautareals einer PR3/NE-defizienten Maus

Aus den Blutgefäßen ausgetretenes Plasma ist durch intravenös injiziertes Evans Blau sichtbar gemacht. Die Ödeme bei Wildtyp-Tieren zeichnen sich durch einen größeren Durchmesser und/oder stärkere Farbintensität aus. Die Doppelpfeile skizzieren die horizontalen und vertikalen Ausmaße der Ödeme.

- c) Die Datenpunkte zeigen die durchschnittliche Ödemintensität einzelner Tiere an, die von 3 Beobachtern unabhängig unter einfachen Blindbedingungen ermittelt wurde. Horizontale Balken markieren den Median.

Die Unterschiede zwischen den beiden Genotypen sind statistisch signifikant (Mann-Whitney U-Test: $p=0,0055$).

Um diesen Befund quantitativ zu überprüfen, wurde an PR3/NE-defizienten und WT-Mäusen eine vergleichende dermale Arthus-Reaktion durchgeführt. Das Ausmaß der Reaktion wurde über die Größe und Intensität der resultierenden Ödeme und Hämorrhagien abgeschätzt. Da für die Ausbildung einer deutlichen Hämorrhagie höhere Antikörperkonzentrationen erforderlich waren, wurde die quantitative Abschätzung der beiden Entzündungsparameter in getrennten Experimenten durchgeführt.

Quantifizierung der Ödeme:

Die Quantifizierung der Ödeme diene insbesondere dazu, die Beteiligung der beiden Serinproteasen PR3 und NE am Entzündungsprozeß zeitlich enger eingrenzen zu können. Ist lediglich die extravasale Migration bei PR3/NE-defizienten Neutrophilen gestört, sollte sich dieser Effekt nicht bereits bei der Ödembildung bemerkbar machen.

5 WT- und 6 PR3/NE-defizienten Mäusen wurde intravenös 20µg Ovalbumin pro Gramm Körpergewicht verabreicht (der Antigenlösung wurde außerdem 0,1% Evans Blau als Serumfarbstoff beigemischt, um den Austritt von Plasma aus den Blutgefäßen in den interstitiellen Raum sichtbar zu machen) und sofort anschließend 10µg Ziege-Anti-Ovalbumin-Antikörper (gereinigte IgG-Fraktion aus Antiserum) intradermal an einer frei rasierten Stelle der ventrolateralen Bauchhaut injiziert. Als Kontrolle wurde je 3 Mäusen intradermal Ziegen-IgG gleicher Konzentration oder PBS intravenös verabreicht. Nach 60 Minuten wurde von den betroffenen Stellen eine Hautbiopsie entnommen. Die Intensität und der Durchmesser der Blaufärbung wurde auf der Innenseite gemäß einer Skala von 0 (keine Färbung) bis 4 (sehr starke Färbung) beurteilt. Die Auswertung wurde von mindestens 3 Beobachtern unabhängig voneinander unter einfachen Blindbedingungen vorgenommen.

Bei WT-Mäusen wurde eine deutlich stärkere Blaufärbung als bei PR3/NE-defizienten Mäusen beobachtet (Abb. 4.3). Bei Kontrolltieren konnte hingegen keine Färbung festgestellt werden (nicht gezeigt). Die erhaltenen Daten beweisen somit, daß PR3 und/oder NE bereits in der Frühphase der dermalen Arthus-Reaktion einen verstärkenden Einfluß ausüben.

Quantifizierung der Hämorrhagien:

4 WT- und 4 PR3/NE-defiziente Mäuse erhielten intravenös 20µg Ovalbumin pro Gramm Körpergewicht und sofort anschließend 50µg Ziege-Anti-Ovalbumin-Antikörper (gereinigte IgG-Fraktion aus Antiserum) intradermal an einer zuvor frei rasierten Stelle der ventrolateralen Bauchhaut. Als Kontrolle wurde je 2 Mäusen intradermal Ziegen-IgG gleicher Konzentration oder PBS intravenös verabreicht. Nach 6 Stunden wurde von den betroffenen Stellen eine Hautbiopsie entnommen. Die Intensität und der Durchmesser der Hämorrhagie wurde auf der Innenseite gemäß einer Skala von 0 (keine Purpura) bis 4 (sehr starke Purpura) beurteilt. Die Auswertung wurde von mindestens 3 Beobachtern unabhängig voneinander unter einfachen Blindbedingungen vorgenommen. Aus Abb. 4.4

geht hervor, daß auch die hämorrhagischen Veränderungen bei Hautbiopsien von Wildtyp-Tieren deutlicher ausgeprägt waren als von PR3/NE-defizienten Tieren. Bei Negativkontrollen wurden keine Hämorrhagien gefunden (nicht gezeigt).

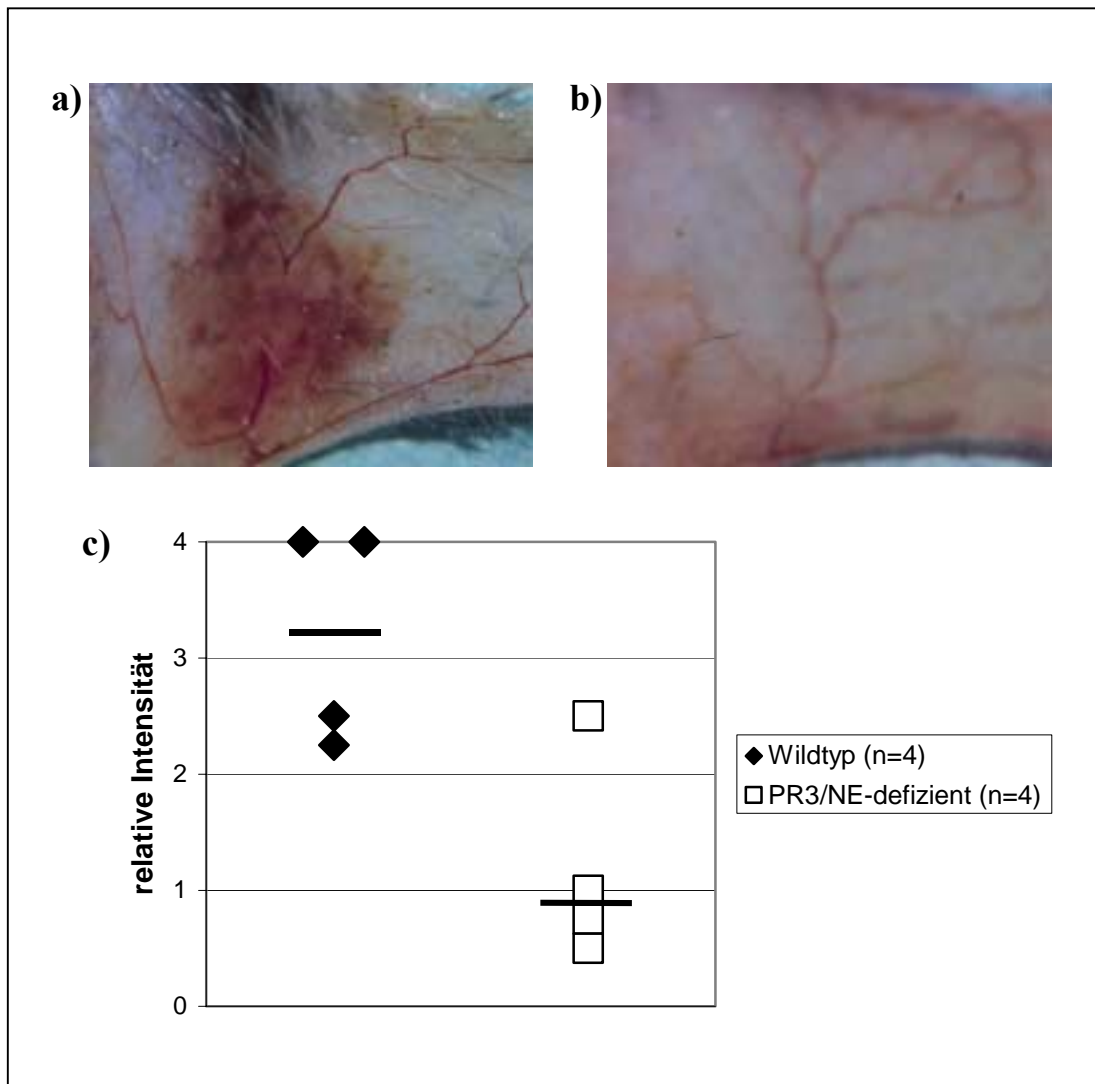


Abb. 4.4: Quantifizierung der lokalen Hämorrhagien 6 Stunden nach einer experimentell induzierten dermalen reversen passiven Arthus-Reaktion.

a) Unterseite des Hautareals einer Wildtyp-Maus

b) Unterseite des Hautareals einer PR3/NE-defizienten Maus

c) Die Datenpunkte zeigen die durchschnittliche Intensität der Purpura einzelner Tiere an, die von 3 Beobachtern unabhängig unter einfachen Blindbedingungen ermittelt wurde. Horizontale Balken markieren den Median. Biopsien von WT-Mäusen zeichnen sich durch eine deutlich stärkere Purpura aus

Die Unterschiede zwischen den beiden Genotypen sind allerdings aufgrund der geringen Fallzahl geringfügig unterhalb des Schwellenwertes für statistische Signifikanz (Mann-Whitney U-Test: $p=0,058$).

4.3.2 Immunkomplexperitonitis

4 PR3/NE-defizienten Mäusen und 4 Wildtyp-Kontrolltieren (jeweils 2 Männchen und 2 Weibchen) wurde zunächst 20µg Ovalbumin pro Gramm Körpergewicht intravenös injiziert und anschließend 800µg Ziege-Anti-Ovalbumin-Antikörper (gereinigte IgG-Fraktion aus Antiserum) intraperitoneal deponiert. Als Kontrolle wurde je 2 Mäusen pro Genotyp PBS intravenös bzw. intraperitoneal verabreicht. Nach 4 Stunden wurde die Peritonealhöhle mit PBS gespült und die Zellzahl des Exsudats im Hämozytometer bestimmt. Die differentielle Identifizierung der verschiedenen Zelltypen erfolgte durch mikroskopische Auswertung „Diff-Quik“-gefärbter Ausstriche. Weiterhin wurde unter Verwendung eines TNF α -spezifischen Festphasenimmunoassays die Konzentration von TNF α im Überstand ermittelt. Ein weiteres Experiment wurde unter identischen Bedingungen durchgeführt, die Inkubationsdauer wurde jedoch auf 6 Stunden verlängert.

4 Stunden nach Induktion der peritonealen Arthus-Reaktion konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen in Bezug auf die Anzahl infiltrierender Granulozyten festgestellt werden (Abb. 4.5, a), linke Hälfte). Bei WT-Tieren konnte jedoch mehr TNF α im Peritonealexsudat als bei PR3/NE-defizienten Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 4.5, a), rechte Hälfte). Allerdings geht aus den erhaltenen Daten auch hervor, daß die Infiltration bzw. TNF α -Spiegel nicht alleine durch Immunkomplexe induziert wurden, da intraperitoneale Kontrollinjektionen von Ovalbumin-Antikörpern alleine ebenfalls Neutrophileninfiltration und TNF α -Sekretion hervorriefen. Bemerkenswerterweise lagen die TNF α -Spiegel auch in diesem Fall bei Wildtyp-Mäusen höher als bei PR3/NE-defizienten Tieren.

In einem weiteren Experiment wurden 6 Stunden nach Induktion der Arthus-Reaktion sehr heterogene Ergebnisse erhalten. Während sich wiederum hinsichtlich der Anzahl infiltrierender neutrophiler Granulozyten zwischen beiden Genotypen kein signifikanter Unterschied ausmachen ließ, hatten sich die Verhältnisse der Zytokinspiegel nahezu umgekehrt: Während die TNF α -Konzentrationen bei WT-Tieren wieder auf Kontrollwerte zurückgegangen waren, wiesen 2 der 4 getesteten PR3/NE-defizienten Mäuse einen deutlich erhöhten TNF α -Spiegel auf (Abb. 4.5, b).

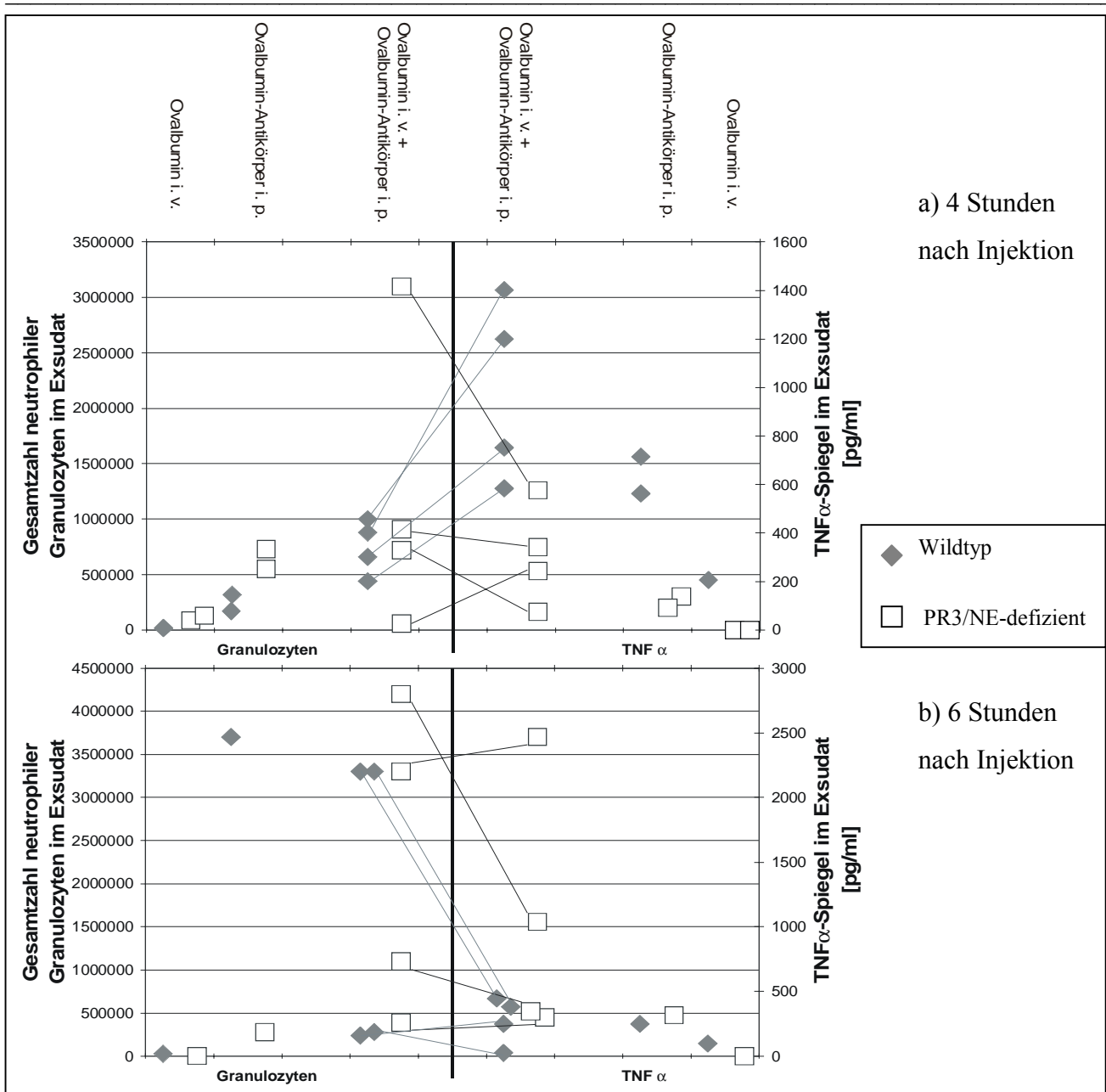


Abb. 4.5: Peritoneale reverse, passive Arthus-Reaktion.

Es wurde die Zellzahl neutrophiler Granulozyten und der TNF α -Spiegel im Peritonealexsudat ermittelt und die erhaltenen Werte für jede Maus einzeln im Diagramm dargestellt. Als Kontrolle wurde nur Ovalbumin-Antikörper bzw. nur Ovalbumin injiziert.

- a) Die Anzahl neutrophiler Granulozyten im Peritonealexsudat (linke Hälfte des Diagramms) 4 Stunden nach der Antikörperinjektion unterscheidet sich nicht zwischen den beiden Genotypen (Mann-Whitney U-Test: $p=0,773$). Die Konzentration an TNF α (rechte Hälfte des Diagramms) ist bei Wildtyp-Tieren jedoch signifikant höher als bei PR3/NE-defizienten Mäusen (Mann-Whitney U-Test: $p=0,021$). Der Antikörper alleine induziert ebenfalls eine inflammatorische Reaktion (siehe Text).
- b) 6 Stunden nach Induktion der Arthus-Reaktion unterscheidet sich die Anzahl der Neutrophilen im Peritonealexsudat nicht (Mann-Whitney U-Test: $p=0,375$). Bei 2 der 4 getesteten PR3/NE-defizienten Mäusen ist der TNF α -Spiegel aber deutlich erhöht. TNF α -Konzentrationen der Wildtyp-Mäuse sind dagegen wieder auf Kontrollwerte zurückgegangen. In den meisten Fällen war die Neutrophilenzahl mit dem TNF α -Spiegel korreliert (Verbindungslinien).

4.4 Herstellung rekombinanter mPR3

Voraussetzung zur Herstellung eines Antiserums mit Anti-mPR3-Aktivität war die Verfügbarkeit des Antigens. Deshalb wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Verfahren zur rekombinanten Expression von mPR3 in *E. coli* entwickelt. Es ist an ein Verfahren angelehnt, das bereits für andere Serinproteasen erfolgreich eingesetzt worden war [338]. Die in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Expression von humaner PR3 in eukaryotischen Zellen sind sehr ineffizient und wurden deshalb nicht gewählt [290, 307, 138]. Andere prokaryotische Expressionssysteme hingegen lieferten nur teilweise korrekt gefaltete Fusionsproteine [138]. Expression muriner PR3 wurde lediglich in einem eukaryotischen System beschrieben, das nach Aufreinigung nur geringe Mengen an aktivem Enzym liefert [153].

4.4.1 Rekombinante Expression von pro-mPR3 in *E. coli*

Murine PR3 wurde unter Verwendung eines Expressionssystems der Firma Novagen zytoplasmatisch in *E. coli* B834 (DE3) exprimiert (eine genaue Beschreibung dieses Systems findet sich in Kap. 3.11). Zunächst wurde wie in Kap. 3.8 beschrieben, die für mPR3 kodierende cDNA mit N-terminaler Extension (für das Propeptid Met-Glu kodierend) in den Vektor pET24cHST (Kap. 8) kloniert. Hierzu wurde die *Nde* I-Schnittstelle der MCS (*multiple cloning site*) verwendet, um einen optimalen Abstand zwischen rbs (*ribosome binding site*) und dem Startkodon ATG zu gewährleisten. Um eine hohe Ausbeute zu erzielen, wurde zuvor mittels Primer-Mutagenese die kodierende Sequenz hinsichtlich der Kodonpräferenz für *E. coli* bis Kodon 9 (ausgehend vom Startkodon) optimiert (Kodon-Präferenz Klasse II nach [71]). Das Gesamtzell-Lysat lieferte nach Induktion jedoch keine erkennbare Bande bei ca. 25kDa in Coomassie-Blue-gefärbtem SDS-Polyacrylamidgel (nicht gezeigt). Im folgenden wurden verschiedene Strategien verfolgt, um durch Abwandlung des Ausgangskonstrukts eine Expression von pro-mPR3 zu realisieren.

Bei der Klonierung des Expressionskonstrukts wurde für die 5'-terminale Schnittstelle der pro-mPR3-cDNA statt *Nde* I für den Restriktionsverdau *Ase* I verwendet (die *Ase* I-Schnittstelle wurde bei oben erwähnter Primer-Mutagenese ebenfalls in die cDNA-Sequenz eingeführt). *Ase* I lieferte zwar kompatible, kohäsive Enden zur *Nde* I-Schnittstelle des Vektors, führte aber gleichzeitig zur Insertion eines Nukleotids zwischen rbs und Startkodon. Bei der bakteriellen Translation spielt die Sequenzlänge stromabwärts der rbs aber für die Anheftung des Initiationskomplexes eine wichtige Rolle [275]. Aus diesem Grund wurde zunächst ein weiteres Konstrukt hergestellt, bei dem das inserierte Nukleotid entfernt wurde. Aber auch hier konnte keine pro-mPR3 im Bakterienlysat detektiert werden (Abb. 4.6, Spur A: mPR3 pET24c/i2).

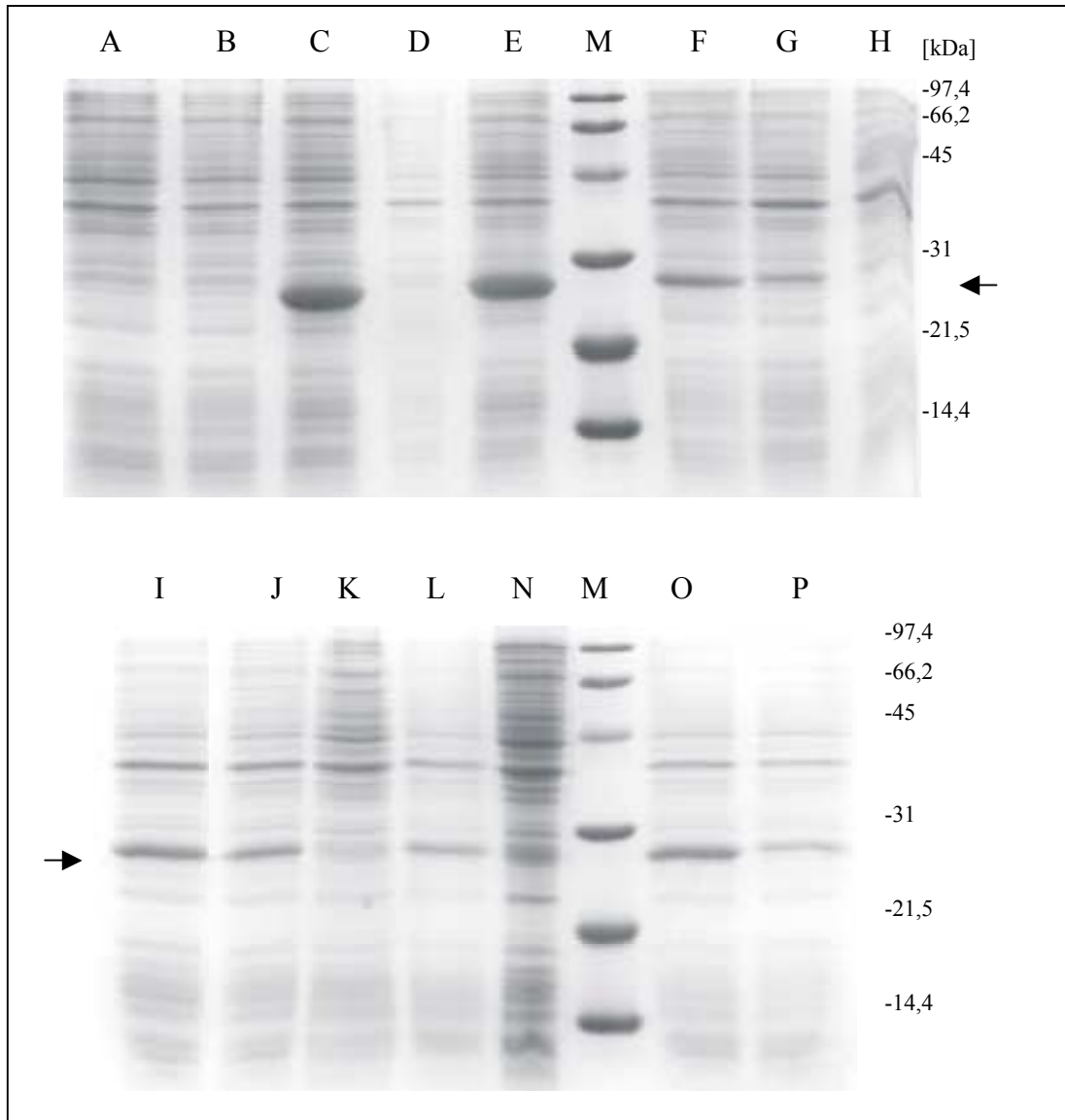


Abb. 4.6: Gesamtzelllysate der Expressionskulturen; die Lyse erfolgte in modifiziertem Laemmli-Puffer wie in Kap. 3.12 beschrieben; Coomassie-Blue-gefärbtes SDS- Polyacrylamidgel; die erwartete Migrationsfront von mPR3 (25 kDa) ist durch einen Pfeil angedeutet; Balkendiagramme symbolisieren schematisch die Zusammensetzung des N-Terminus von Ile-16 bis Glu-60 (Chymotrypsinogennummerierung) der Expressionskonstrukte aus Sequenzen von mPR3 (blau) und hGzmK (grün, Details hierzu auf Seite 65).

- | | | | |
|----------------------|--|------------------------------|-----------------------|
| A: mPR3 pET24c/i2 | | B: mPR3pET24c/C-S | |
| C: mPR3pET24c/F1 | | D: mPR3pET24c/F2 | |
| E: mPR3pET24c/F3b | | F: mPR3pET24c/F4 | |
| G: mPR3pET24c/F5a | | H: mPR3pET24c/F5b | |
| I: mPR3pET24c/F5c | | J: mPR3pET24c/F3a* | |
| K: mPR3pET24c/F3a** | | M: Molekulargewichtsstandard | N: mPR3pET24c/F3a**** |
| L: mPR3pET24c/F3a*** | | | |
| O: mPR3pET24c/F6a | | P: mPR3pET24c/F6b | |

* Zellen wurden verdünnt und wiederholt aufgeköcht

** Zellen wurden nur einmal aufgeköcht, ohne zusätzliches SDS/β-ME

*** wie J, jedoch Wirtsbakterien *E. coli* BL21

**** Zellen für die Lyse nicht verdünnt

Es wurde außerdem in Betracht gezogen, daß bakterizide oder bakteriostatische Eigenschaften der PR3 die Expression in *E. coli* behindern [47] oder während der Expressionsphase einen negativen Selektionsdruck auf stark exprimierende Bakterienklone ausüben könnten (weshalb sich bakterizide oder bakteriostatische Eigenschaften des rekombinanten Proteins nicht zwingend über die Ermittlung der Wachstumsrate nachweisen lassen). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde zunächst in Proteindatenbanken (Swiss-Prot) nach bakteriziden Proteinen mit hoher N-terminaler Homologie zu mPR3 gesucht. Das humane antimikrobielle Protein CAP 37 aus Neutrophilen-Granula (*cationic antimicrobial protein of molecular mass 37kDa*, Synonym: Azurocidin) weist eine sehr hohe Sequenzhomologie zu Neutrophilen-Serinproteasen auf (z. B. 45% Homologie zu humaner Neutrophilen-Elastase, [238]). Aber insbesondere die bakterizide Domäne (AS 33-60) zeigte eine hohe Übereinstimmung mit der Primärstruktur von mPR3. Pereira und Mitarbeiter konnten zeigen, daß ein synthetisches Peptid, welches die Aminosäuresequenz der bakteriziden Domäne umfaßt, eine antibakterielle Wirkung gegen gram-negative Bakterien entfaltet [232, 239]. Die bakteriziden Eigenschaften konnten jedoch vollständig getilgt werden, wenn eines der beiden Cystein-Reste (s. Abb. 4.7) durch Serin ersetzt wurde. Diese Ergebnisse legten zweierlei Strategien für die weitere Optimierung des Expressionskonstrukts nahe:

1. Austausch eines Cysteinrestes im Bereich der putativ bakteriziden Domäne der mPR3. Die für die antibakteriellen Eigenschaften essentielle Disulfidbrücke kann nicht mehr ausgebildet werden.
2. Austausch der gesamten Sequenz der putativ bakteriziden Domäne durch den homologen Sequenzabschnitt aus hGzmK, einer nahe verwandten Serinprotease, die, wie bereits erwähnt, erfolgreich im gleichen Expressionssystem generiert wurde.

Die Umsetzung dieser Strategie erfolgte durch die Herstellung von 3 verschiedenen Expressionskonstrukten (Chymotrypsinogennumerierung):

- mPR3pET24c/F1: Methionin (erste Aminosäure des Propeptids) bis Glutamat-60 durch homologe Sequenz aus hGzmK ersetzt (Austausch des gesamten N-Terminus bis AS 60).
- mPR3pET24c/F2: Tyrosin-29 bis Glutamat-60 durch homologe Sequenz aus hGzmK ersetzt (Austausch der putativ bakteriziden Domäne).
- mPR3pET24c/C-S: Cystein-58 mutiert zu Serin.

Mit Hilfe dieser Konstrukte war es möglich, gezielt zu untersuchen, ob die putativ bakterizide Domäne allein verantwortlich für die fehlende Expression ist oder ob benachbarte N-terminale Sequenzen ebenfalls involviert sind.

| | | | | | | | |
|--------|----|-----------------|-----------|-------------------|---------------|------|----|
| CAP 37 | 33 | -N-Q----- | G-R-H-F-C | G-G-A-L-I-H-A-R-F | V-M-T-A-A-S-C | F-Q- | 60 |
| hCat G | 33 | -I-Q-----S-P-A- | G-Q-S-R-C | G-G-F-L-V-R-E-D-F | V-L-T-A-A-H-C | W-G- | 60 |
| hNE | 33 | -L-R----- | G-G-H-F-C | G-A-T-L-I-A-P-N-F | V-M-S-A-A-H-C | V-A- | 60 |
| hGzmK | 33 | -I-Q-----Y-G- | G-H-H-V-C | G-G-V-L-I-D-P-Q-W | V-L-T-A-A-H-C | Q-Y- | 60 |
| mPR3 | 33 | -L-Q-L-S-R-F-P- | G-S-H-F-C | G-G-T-L-I-H-P-R-F | V-L-T-A-A-H-C | L-Q- | 60 |

Abb.4.7: Aminosäuresequenzvergleich im Bereich der bakteriziden Domäne von CAP37 mit humanen Neutrophilen-Serinproteasen und mPR3.

Schwarze vertikale Balken zeigen Übereinstimmung in allen, graue Balken bei mindestens einem der alinierten Proteine an.

Die bei Serinproteasen und CAP37 hochkonservierte Disulfidbrücke ist gelb skizziert.

Aminosäuren, die beim Austausch der putativ bakteriziden Domäne von mPR3 durch die homologe Sequenz von hGzmK ersetzt oder deletiert wurden, sind fett kursiv dargestellt.

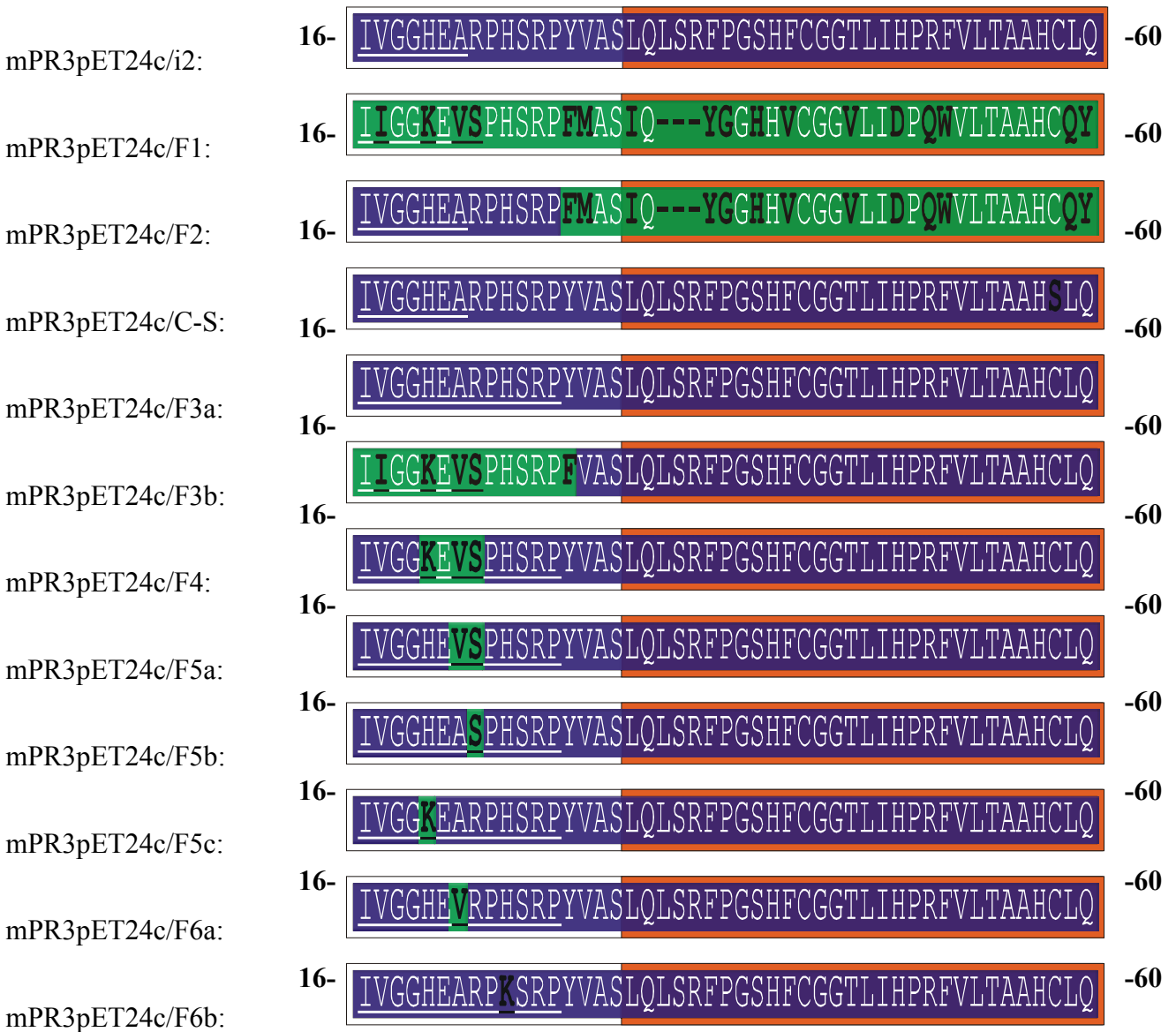
CAP37, humanes CAP37; hCatG, humanes Cathepsin G; hNE, humane Neutrophilen-Elastase; hGzmK, humanes Granzym K.

Es erschien außerdem möglich, daß während der Wachstumsphase vor Induktion in Abwesenheit des katabolischen Repressors Glukose bereits geringe Mengen pro-mPR3 translatiert wurden und folglich eine negative Selektion stattfindet. Daher wurde das Expressionskonstrukt mPR3 pET24c/i2 alternativ in das Wirtsbakterium *E. coli* BLR (DE3) pLysS transformiert. Dieser kommerziell erhältliche Bakterienstamm (Novagen) ist mit dem Vektor pACYC184, der eine schwache, konstitutive intrazelluläre Expression von T7 Lysozym bewirkt, kotransfiziert [55]. T7 Lysozym kann unter anderem an T7 RNA Polymerase binden und so die Translation der unter der Kontrolle des T7 Promotors stehenden pro-mPR3 inhibieren [300]. Eine Negativselektion vor der Induktion konnte auf diese Weise nahezu ausgeschlossen werden. Im Bakterienlysat induzierter Zellen ließ sich pro-mPR3 jedoch im Coomassie-Blue-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel nicht nachweisen (nicht gezeigt).

Die Analyse des Gesamtzelllysats induzierter Bakterienkulturen der oben beschriebenen Klone lieferte indes den Beweis, daß nicht die putativ bakterizide Domäne eine Expression verhindert, da weder eine Coomassie-Blue-gefärbte Bande korrekter Größe im Zellysat mPR3pET24c/F2-transfizierter noch mPR3pET24c/C-S-transfizierter Bakterien zu detektieren war. Für das Expressionskonstrukt mPR3pET24c/F1 hingegen wurde eine starke Expression beobachtet, die als prominenteste Bande im Zellysat sichtbar war (Abb. 4.6, Spur D, B, C). Der für die Fragestellung entscheidende Bereich mußte also im Abschnitt der ersten 16 Aminosäuren zu finden sein, was sich durch die Analyse eines weiteren Expressionskonstrukts mit einem homologen Sequenztausch bis Tyrosin-29 (mPR3pET24c/F3b, Abb. 4.6, Spur E) bestätigte. Um das zu exprimierende Fusionsprotein möglichst stark an die Primärstruktur der nativen mPR3 anzunähern, wurden insgesamt 6 Expressionskonstrukte hergestellt, bei denen wenige Aminosäuren in diesem Bereich ausgetauscht wurden. Es zeigte sich,

daß der Austausch bestimmter einzelner Aminosäuren hinreichend war, um rekombinantes Protein im Zellysat nachzuweisen. Überraschenderweise war dies bei ausgesprochen konservativen Mutationen der Fall: Austausch einer basischen Aminosäure gegen eine basische (Konstrukte mPR3pET24c/F5c und mPR3pET24c/F6b Histidin getauscht gegen Lysin, Abb. 4.6, Spur I und P) und Tausch einer hydrophoben Aminosäure gegen eine andere hydrophobe (Konstrukt mPR3pET24c/F6a, Alanin-22 getauscht gegen Valin, Abb. 4.6, Spur O). Hingegen hatte der Austausch Arginin-23 gegen Serin keine Auswirkung auf die Expressioneffizienz (Konstrukt mPR3pET24c/F5b, Abb. 4.6, Spur H).

N-terminale Aminosäuresequenz der Expressionskonstrukte von Ile-16 bis Glu-60 (Chymotrypsinogennumerierung, die bakterizide Domäne ist rot unterlegt. Die Herkunft der Aminosäuresequenz ist durch blaue (mPR3) bzw. grüne (hGzmK) Unterlegung gekennzeichnet. Die von der natürlichen mPR3-Sequenz abweichenden Aminosäuren sind schwarz dargestellt. Kodonoptimierte cDNA-Sequenzen sind durch Unterstreichung der entsprechenden Aminosäuren angedeutet):



Alternativ wurde ein weiteres Expressionskonstrukt generiert, bei dem nur sog. „stille Mutationen“ eingeführt wurden (Konstrukt mPR3pET24c/F3a). Die kodierende Sequenz wurde dadurch hinsichtlich der Kodonpräferenz für *E. coli* bis Kodon 15 (ausgehend vom Startkodon) optimiert. Auch mit diesem Konstrukt konnte zunächst keine Expression beobachtet werden.

Weil einerseits der Austausch einzelner homologer Aminosäuren erfolgreich war, andererseits eine Kodonoptimierung im selben Bereich keine Auswirkungen hatte, wurde vermutet, daß das Fehlen der Expression mit dem optimierten Konstrukt mPR3pET24c/F3a durch physikochemische Eigenschaften des exprimierten Proteins hervorgerufen wurde. Zytoplasmatisch überexprimierte heterologe Proteine in *E. coli* liegen in den meisten Fällen als sog. Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*), also in Aggregatform, vor [201]. Es wurde vermutet, daß pro-rmPR3 aufgrund seiner Hydrophobizität, die aufgrund fehlender Glykosylierung besonders stark ausgeprägt sein könnte, möglicherweise besonders schwer lösliche Aggregate bildet. Aus diesem Grund wurden Bakterienkulturen in verschiedenen Verdünnungen und unter wiederholtem Abkühlen und Aufkochen in modifiziertem Laemmli-Puffer (Kap. 3.12) aufgeschlossen. Auf diese Weise ließ sich schließlich für das Konstrukt mPR3pET24c/F3a eine Coomassie-Blue-gefärbte Bande im SDS-Polyacrylamidgel mit einem Molekulargewicht von ca. 25kDa nachweisen.

Die durch Coomassie-Blue-Färbung sichtbar gemachten Proteinbanden der einzelnen Expressionen lassen somit nicht direkt auf die Expressionseffizienz schließen. Die Unterschiede der Bandenintensität beruhen vermutlich teilweise oder vollständig auf der unterschiedlichen Löslichkeit der Polypeptidketten in Laemmli-Puffer. Da die Aminosäuresequenz von rmPR3 im Konstrukt mPR3pET24c/F3a der natürlichen mPR3-Sequenz entspricht (mit der Prosequenz ersetzt durch M-E), wurde es für alle folgenden Schritte eingesetzt.

4.4.2 Solubilisierung und Renaturierung von pro-rmPR3

Das als Einschlusskörpermaterial im Zytoplasma von *E. coli* vorliegende Protein wurde als Ausgangsmaterial für die Gewinnung korrekt gefalteter rmPR3 bzw. pro-rmPR3 herangezogen. Hierzu mußte zunächst das unlösliche Protein gewonnen und von bakteriellen Kontaminationen wie Membranproteinen durch Detergens unter Hochsalzbedingungen gereinigt werden. Mit dieser Methode wurde pro-rmPR3 bereits stark angereichert, jedoch nicht vollständig von Kontaminationen befreit (Abb. 4.8).

Da leichte Verunreinigungen den Renaturierungsprozess kaum beeinträchtigen [263], wurde das gewonnene Material unmittelbar in hochmolarem Guanidiniumchlorid solubilisiert. Zusätzlich wurde ein Glutathion-Redoxsystem zur Derivatisierung eingesetzt. Um eine vollständige Solubilisierung des

schwer löslichen Materials zu erreichen, mußte die Einschlusskörpersuspension im Solubilisierungspuffer mehrfach durch Ultraschall aufgeschlossen werden.

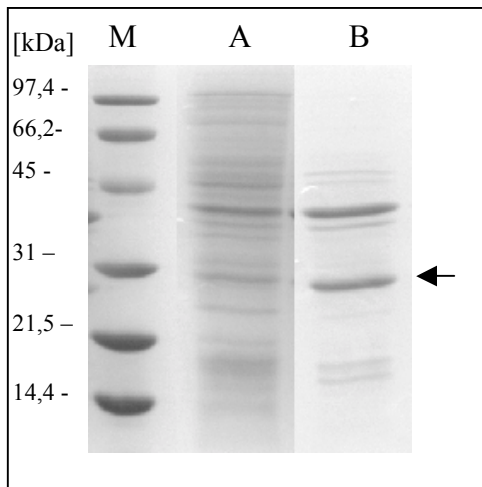


Abb. 4.8: Coomassie-Blue-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel; die gewaschene Einschlusskörperpräparation ist bereits mit pro-mPR3 angereichert

M, Molekulargewichtsstandard;

A, Gesamtzelllysate;

B, Einschlusskörper- (IB-) Präparation.

Die Position von mPR3 ist durch einen Pfeil angedeutet.

Das solubilierte Material wurde durch rasches Verdünnen in physiologischem Puffer bei pH 8,5 renaturiert. Zunächst wurde das Solubilisat (max. 5mg/ml) in 3 Pulsen bei 4°C jeweils 1:100 in Renaturierungspuffer verdünnt, eingeengt und über hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) aufgereinigt. In den Elutionsfraktionen wurden jedoch 3 unterschiedliche Proteine von jeweils 25kDa, 20 kDa und 5kDa detektiert (Abb. 4.9, Spur A/B).

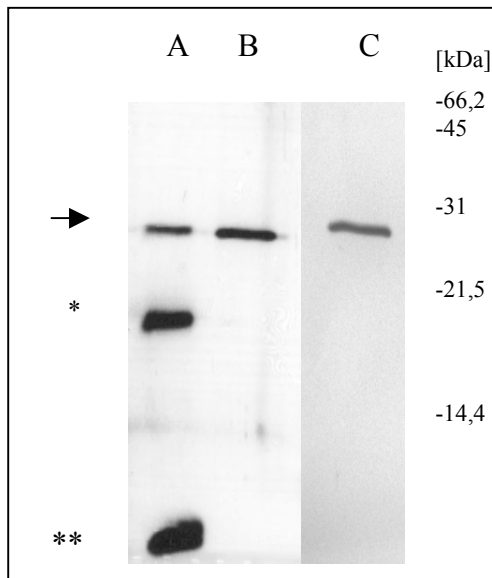


Abb. 4.9:

Silbergel: FPLC-gereinigtes pro-rmPR3.

A und B: frühe (A) und späte (B) Fraktion des Elutionspeaks; neben intakter pro-rmPR3 (Pfeil) enthält das Eluat 2 Spaltfragmente von ca. 20kDa (*) und 5kDa (**); die Spaltfragmente gehen eine schwächere hydrophobe Wechselwirkung mit der Chromatographiematrix ein und eluieren deshalb früher als intaktes Protein

C: das abgeänderte Rückfaltungsprotokoll (siehe Text) erzielt nahezu ungespaltenes Enzym, nach der FPLC sind keine Kontaminationen detektierbar.

Durch aminoterminaler Proteinsequenzierung konnten die beiden kleineren Produkte als Spaltfragmente von pro-rmPR3 identifiziert werden. Als Spaltstelle wurde durch N-terminale Aminosäuresequenzierung die Peptidbindung zwischen Ala-187 und Ala-188 (Chymo-

trypsinogennumerierung) identifiziert. Als Nebensequenz wurde eine zweite Spaltstelle zwischen Gly-189 und Ile-190 nachgewiesen. Aufgrund der beobachteten Instabilität des Enzyms wurde die Vorgehensweise zur Renaturierung angepaßt. Wie in Kap. 4.5.2 dargestellt ist, beruht die beobachtete Instabilität vermutlich auf einer spezifischen (möglicherweise autokatalytischen?) Spaltung. Da mPR3 maximale katalytische Aktivität in schwach alkalischen Puffern aufweist, wurde die Inkubationszeit im Renaturierungspuffer (pH 8,5!) auf 12 Stunden verkürzt. Um Verluste durch unvollständige Rückfaltung zu minimieren, wurde die Verkürzung der Inkubationszeit durch Erhöhung der Reaktionstemperatur kompensiert. Die Proteinlösung wurde außerdem sofort anschließend auf ca. 1/10 des Ausgangsvolumens eingengt und gegen sauren Acetatpuffer (pH 5,5) dialysiert. Nach Aufreinigung über HIC wurde die Proteinlösung mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließender Coomassie-Blue-Färbung analysiert. Es konnte gezeigt werden, daß sich der Anteil der Spaltfragmente mit der genannten Methode reduzieren läßt. Der verbleibende Anteil an Abbaufragmenten wurde anhand der Bandenintensität für manche Präparationen auf max. 5% geschätzt; Abb. 4.9 (Spur C) zeigt eine Präparation ohne detektierbare Spaltfragmente. Nach Dialyse gegen Acetatpuffer wurden die Proteinlösungen für enzymatische Tests und Immunisierungen eingesetzt. Eine weitere Volumenreduktion durch Ultrafiltration wurde nicht durchgeführt, da sie aufgrund der Hydrophobizität von pro-rmPR3 bzw. rmPR3 mit hohen Verlusten durch Präzipitation und Adsorption verbunden war. Detergenzien zur Verlustminimierung wurden nicht eingesetzt, da sie die hydrophobe Wechselwirkung zwischen Protein und Chromatographiematrix beim folgenden Aufreinigungsprozeß beeinträchtigen.

4.4.3 Konvertierung von pro-rmPR3 zu katalytisch aktiver rmPR3

In vivo werden Granula-assoziierte Serinproteasen im rauhen endoplasmatischen Retikulum als Proenzyme synthetisiert und anschließend in zwei Schritten prozessiert: Zunächst wird das Signalpeptid abgespalten und anschließend erfolgt die Entfernung des Propeptids während des Transports in die Granula. Die Abspaltung des Propeptids wird bei fast allen Serinproteasen myeloider und lymphoider Granula durch Cathepsin C (Dipeptidylpeptidase I) vermittelt [207, 236]. Es spaltet sukzessive Dipeptide vom N-Terminus ab. Die rekombinante Expression von mPR3 in der vorliegenden Arbeit erfolgte ebenfalls zunächst als Proform, da der bei Serinproteasen hochkonservierte N-Terminus Isoleucin nicht unmittelbar generiert werden kann. Deshalb wurde die erste Aminosäure Methionin der translatierten Sequenz, die vom Startkodon ATG kodiert wird, in das Propeptid inkorporiert, gefolgt von einem Glutamatrest. Dieses Dipeptid wird *in vitro* sehr effizient von bovinem Cathepsin C abgespalten [338]. Der Verlauf der Konvertierungsreaktion konnte direkt

durch Messung der enzymatischen Aktivität verfolgt werden (Abb. 4.10). Weiterhin wurde die Vollständigkeit der Konvertierungsreaktion durch N-terminale Proteinsequenzierung, die ausschließlich die Sequenz Ile-Val-Gly-Gly ergab (entspricht dem nativen N-Terminus von mPR3), bestätigt. Diese Ergebnisse zeigen, daß die rekombinant hergestellte mPR3 ihre aktive Konformation unter Bildung der Salzbrücke zwischen Ile des reifen N-Terminus mit Asp-194 (Chymotrypsinnumerierung) einnehmen kann und keine kleineren Spaltprodukte über den konservierten N-Terminus hinaus entstehen.

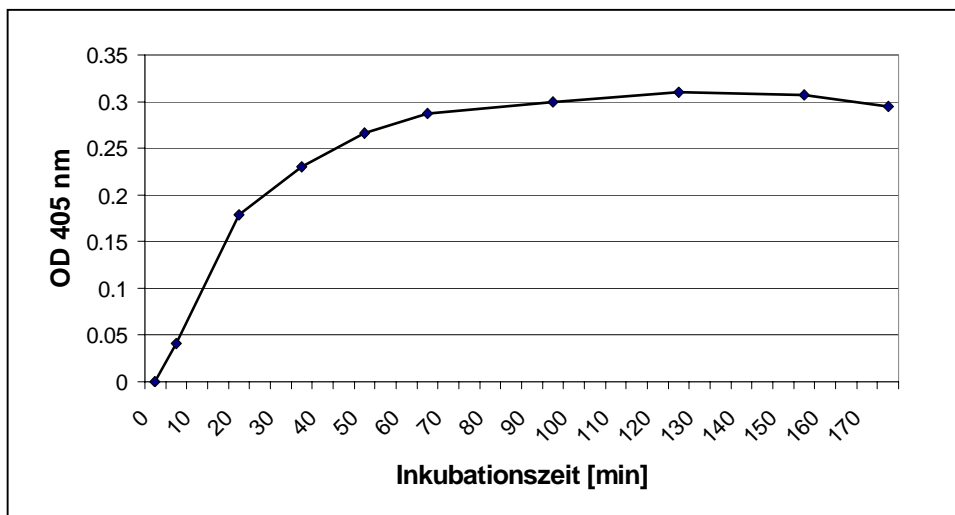


Abb. 4.10: Beispiel einer Konvertierungsreaktion von pro-rmPR3 zu katalytisch aktiver rmPR3

Dem Reaktionsgemisch aus pro-rmPR3 und bovinem Cathepsin C (hier: 16ng/µg pro-rmPR3) wurde zu regelmäßigen Zeitpunkten eine Probe (entsprechend 500ng zu konvertierender pro-rmPR3) entnommen und mit dem Substratpuffer 30 Minuten inkubiert.

Das synthetische, chromogene Substrat MeOSuc-AAPV-pNA wird nicht von pro-rmPR3 hydrolysiert (Zeitpunkt 0). Nach Zugabe von Cathepsin C läßt sich über die steigende Absorption, die durch die Abspaltung der Nitroanilidgruppe hervorgerufen wird, eine zunehmende Aktivität beobachten. Nach 2 Stunden ist pro-rmPR3 fast vollständig konvertiert. Später erfolgt eine Abnahme der Bruttoaktivität, die vermutlich von einer Reduzierung der Disulfidbrücken der aktiven rmPR3 und folgender Destabilisierung der Struktur durch im Konvertierungspuffer enthaltenes DTE (1 µM) herrührt. Bei einigen präparativen Konvertierungsansätzen wurde bis zu 8 Stunden eine Zunahme der Aktivität beobachtet.

4.5 Biochemische Charakterisierung von pro-rmPR3 bzw. rmPR3

4.5.1 Konvertierte pro-rmPR3 ist katalytisch aktiv

Zur Bestimmung der katalytischen Aktivität von rekombinant hergestellter mPR3 wurde das synthetische, chromogene Tetrapeptid N-Methoxysuccinyl-Alanyl-Alanyl-Prolyl-Valyl-paranitroanilid (AAPV-pNA) verwendet. Es ermöglicht die quantitative Bestimmung der enzymatischen Aktivität Elastase-ähnlicher Serinproteasen, indem die enzymvermittelte Abspaltung der chromogenen Gruppe spektrophotometrisch bestimmt wird. Dieses Substrat vereint größtmögliche Spezifität mit hoher Sensitivität für Elastase-ähnliche Serinproteasen. Die hohe Sequenzhomologie zu Neutrophilen-Elastase (NE) im Bereich der Substratbindungsstellen verhindert aber eine Diskriminierung der beiden Serinproteasen bezüglich ihrer Esterase-Aktivität gegen dieses Substrat: PR3 wie auch NE spalten bevorzugt Substrate mit kleinen aliphatischen Aminosäuren an der P₁-Stelle wie Alanin, Serin oder Valin [246]. Das Prolin in der P₂-Position begrenzt die Spaltbarkeit des Substrats außerdem auf Serinproteasen [312, 313]. Es konnte gezeigt werden, daß der wichtigste physiologische Inhibitor humaner PR3, α 1-Antitrypsin, die Hydrolyse des Substrats durch rmPR3 inhibiert (Abb. 4.11). Die gefundenen Ergebnisse lassen vermuten, daß das rekombinant hergestellte Protein korrekt prozessiert und gefaltet ist und somit nativer mPR3 funktionell entspricht.

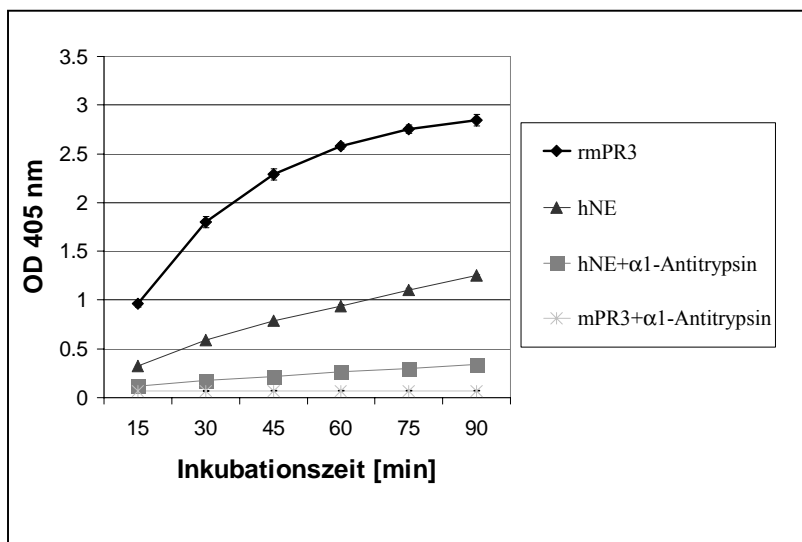


Abb. 4.11: Die enzymatische Aktivität rekombinanter mPR3 wird durch bovines α 1-AT inhibiert.

Es wurden 1 μ g rmPR3 bzw. 285ng hNE mit 1mM Substrat (MeOSuc-AAPV-pNA) in Reaktionspuffer inkubiert und die Farbentwicklung bei 405nm in Triplikaten über 90 Minuten gemessen. Die Inhibition erfolgte durch Präinkubation mit 4-fachem molarem Überschuß an α 1-AT für 20 Minuten bei 37°C. Rekombinante mPR3 wird von bovinem α 1-AT stärker inhibiert, als hNE.

4.5.2 Pro-rmPR3 und rmPR3 wird von humaner Neutrophilen-Elastase gespalten

PR3 ist eine von drei katalytisch aktiven Serinproteasen in azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten: Cathepsin G und Elastase werden neben PR3 als prozessierte, katalytisch aktive Enzyme gespeichert und nach Aktivierung der Granulozyten freigesetzt [248, 112]. Durch Spaltung oder limitierte Proteolyse können sie die Eigenschaften anderer, gleichzeitig freigesetzter Proteine modulieren. Unter anderem können sie z. B. nach Degranulation eine proteolytische Kaskade auslösen, die zur Aktivierung latenter Matrix-Metalloproteasen führt [231, 326, 266, 101]. Elastase kann zudem durch enzymatische Abspaltung von Propeptiden die antibakterielle Domäne von Cathelicidinen (Bactenezinen) aktivieren [277] (Zusammenfassung zum Thema Cathelicidine in [349]). Die proteolytische (oder autolytische) Regulation der Aktivität von Serinproteasen durch andere Serinproteasen ist zudem ein weit verbreiteter Mechanismus (z. B. in der Blutgerinnungskaskade [72, 202]).

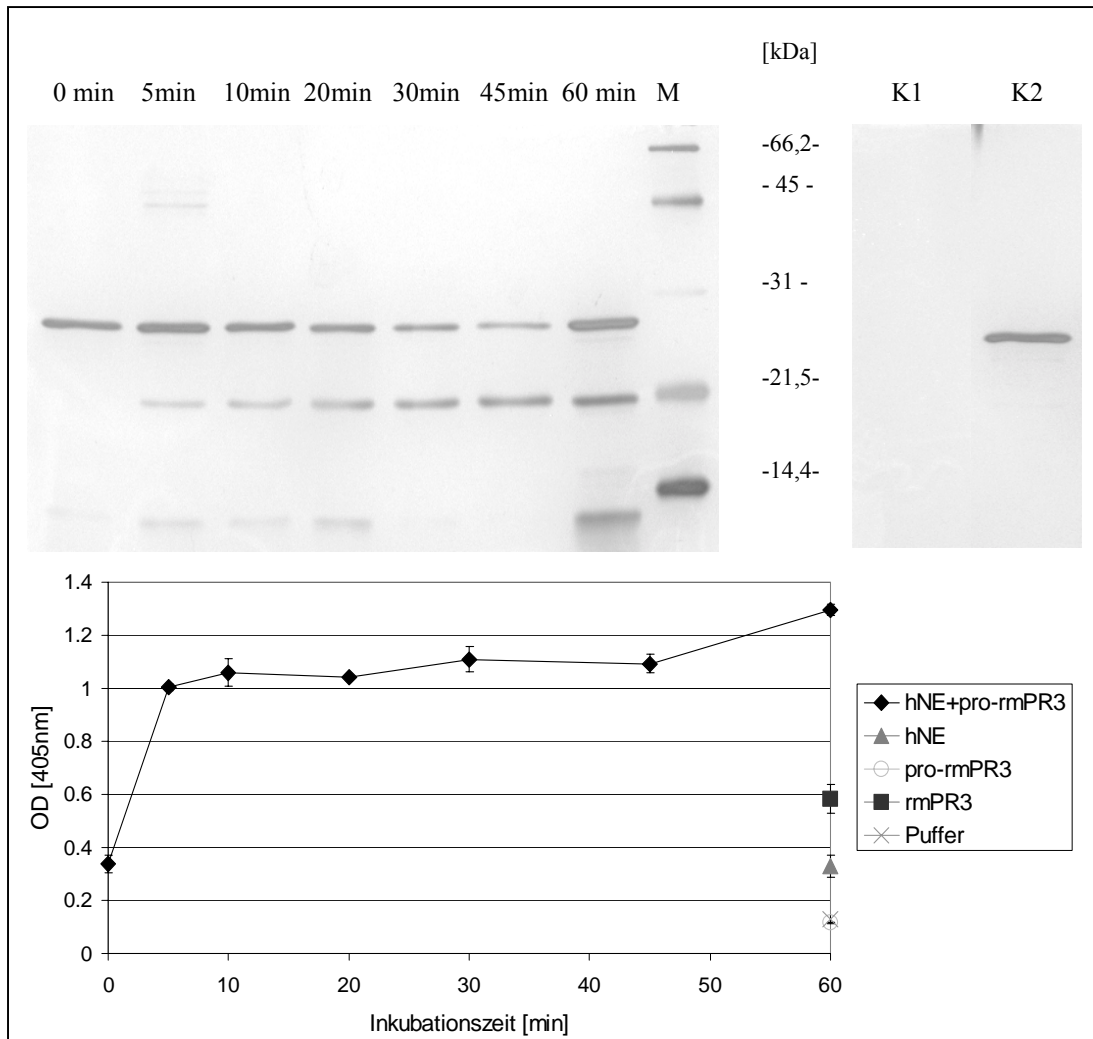


Abb. 4.12: pro-rmPR3 wird von hNE gespalten

Ein Gemisch aus 20µg/ml pro-rmPR3 und 10µg/ml hNE wurde bei 37°C inkubiert und zu den angegebenen Zeiten Proben entnommen. Im Verlauf der Inkubation wird pro-rmPR3 in ein ca. 20 und 5kDa-Fragment gespalten; im Gemisch läßt sich außerdem eine erhöhte enzymatische Aktivität nachweisen, die deutlich über der von hNE liegt. Da sich mit dem verwendeten Substrat PR3- und NE-Aktivität nicht unterscheiden läßt, besitzt das Gemisch zum Zeitpunkt 0 bereits Aktivität, die aber ausschließlich von hNE herrührt. Als Kontrollen wurden hNE ohne pro-rmPR3 (K1) und pro-rmPR3 ohne hNE (K2) 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

Oben: reduzierende 15% SDS-PAGE, Silbernitratfärbung; hNE (K1) ist aufgrund seiner schlechteren Anfärbbarkeit und der geringeren Konzentration nicht erkennbar, die sichtbaren Banden repräsentieren daher ausschließlich pro-rmPR3; M=Molekulargewichtsstandard

Unten: Dem Inkubationsgemisch entnommene Proben (200nM pro-rmPR3/100nM hNE) wurden mit 1mM AAPV-pNA quantitativ auf ihre Bruttoaktivität untersucht; als zusätzliche Positivkontrolle wurde 200nM rmPR3 verwendet; Messungen der optischen Dichte (OD) erfolgten in Triplikaten bei 405nm; die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Messung an.

Da rekombinant exprimierte mPR3 auch als Zymogen gewonnen wurde, konnte geprüft werden, ob auch für Serinproteasen azurophiler Granula vergleichbare Wechselwirkungen existieren.

Hierzu wurde zunächst pro-rmPR3 im molaren Verhältnis 2:1 mit hNE (ICN Biochemicals) bei 37°C inkubiert. In regelmäßigen Intervallen wurden Proben entnommen und im Silbergel analysiert. Weiterhin wurde die Bruttoaktivität des Gemisches mit dem synthetischen, chromogenen Substrat MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA bestimmt. Bereits nach 5 Minuten konnten im Silbergel neben pro-rmPR3 zwei zusätzliche Banden bei ca. 20kDa und ca. 5kDa detektiert werden. Die Bandenintensität nahm im Verlauf der Inkubation weiter zu, während gleichzeitig die pro-rmPR3-Bande schwächer wurde (Abb. 4.12). Die Größe dieser Banden entsprach den in Kap. 4.4.2 entdeckten Spaltprodukten. Nach 5 Minuten war außerdem ein sprunghafter Anstieg der Bruttoaktivität des Gemisches meßbar. Die Koinkubation von rmPR3 mit pro-rmPR3 resultierte ebenfalls in einer deutlichen Verstärkung der Bruttoaktivität, Spaltfragmente konnten allerdings nicht detektiert werden (nicht gezeigt). Weiterhin wurde gefunden, daß hPR3 weder von hNE gespalten wird, noch konnten vergleichbare Schwankungen der Bruttoaktivität eines Gemischs aus hNE/hPR3 festgestellt werden (nicht gezeigt).

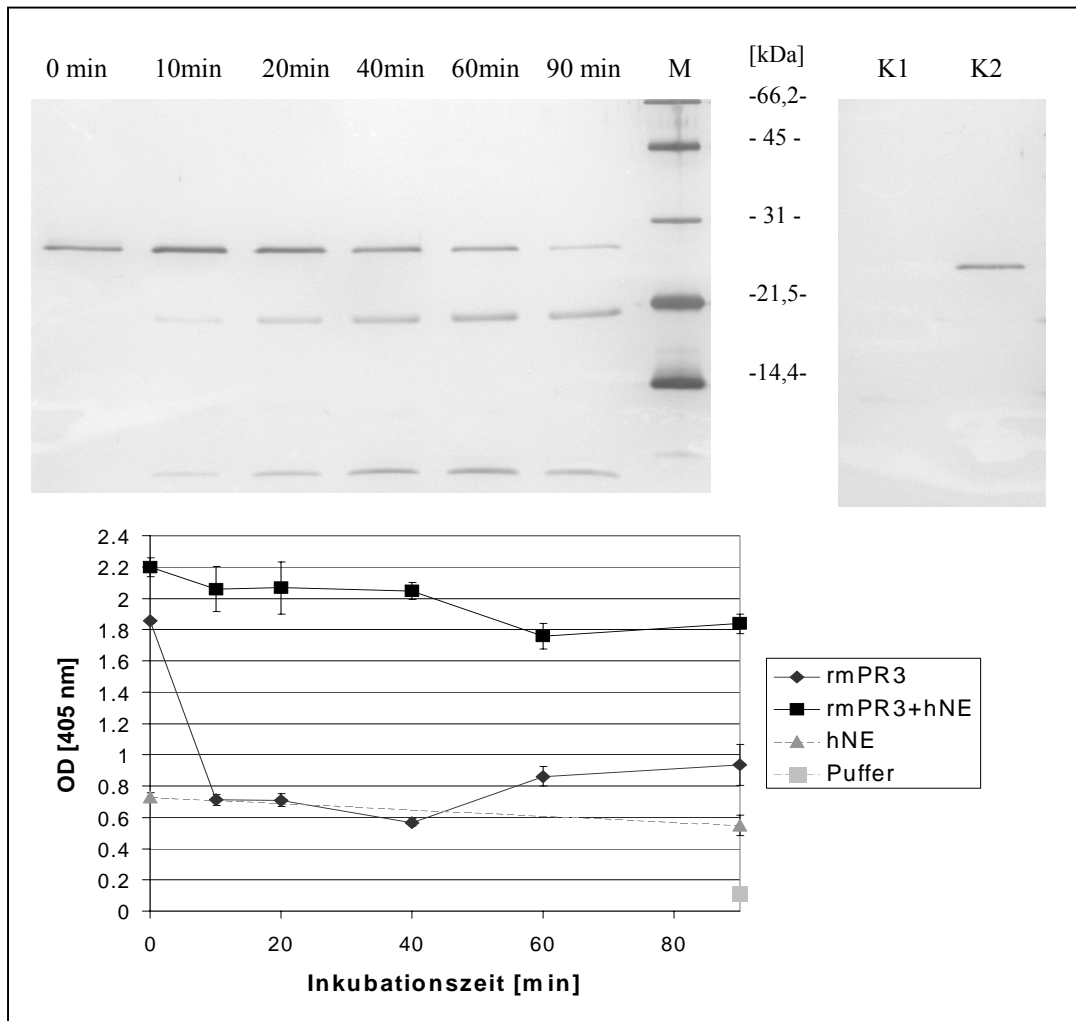


Abb. 4.13: rmPR3 wird von hNE gespalten

Der Versuchsablauf ist identisch zu dem im Abb. 4.12, es wurde jedoch pro-rmPR3 durch rmPR3 ersetzt. Ähnlich wie pro-rmPR3 wird auch rmPR3 von hNE in Fragmente von ca. 20kDa und ca. 5kDa gespalten. Während des Inkubationszeitraums verringert sich die Bruttoaktivität des Gemisches rmPR3/hNE nur schwach, hingegen fällt die Aktivität von rmPR3 in Abwesenheit von hNE deutlich ab. Als Kontrollen wurden hNE ohne rmPR3 (K1) und rmPR3 ohne hNE (K2) 90 Minuten bei 37°C inkubiert.

Oben: reduzierende 15% SDS-PAGE, Silbernitratfärbung; K1, hNE; K2, rmPR3; M, Molekulargewichtsstandard

Unten: Dem Inkubationsgemisch entnommene Proben (200nM rmPR3/100nM hNE bzw. 200nM rmPR3 ohne hNE) wurden mit 1mM AAPV-pNA quantitativ auf ihre Bruttoaktivität untersucht; die Aktivität von hNE nimmt während des Versuchzeitraums schwach ab; Messungen der optischen Dichte (OD) erfolgten in Triplikaten bei 405nm; die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Messung an.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß auch rmPR3 innerhalb von 90 Minuten von hNE nahezu quantitativ in Produkte derselben Größe gespalten wurde. Während das Gemisch rmPR3/hNE über den gesamten Zeitraum nahezu gleichbleibende Aktivität aufwies, ging die Inkubation von rmPR3 alleine mit einem deutlichen Aktivitätsverlust innerhalb der ersten 10 Minuten einher (Abb. 4.13, der Aktivitätsverlust von rmPR3 allein in Testpuffer ließ sich jedoch in weiteren Kontrollexperimenten nicht immer in gleicher Weise reproduzieren).

Durch N-terminale Aminosäuresequenzierung beider Spaltprodukte wurde bei rmPR3 und pro-rmPR3 die Peptidbindung zwischen Ala-187 und Ala-188 (Chymotrypsinogennumerierung) als Spaltstelle identifiziert (Nebensequenzen, die von hNE herrühren könnten, wurden nicht gefunden). Um zu prüfen, ob die Spaltung von pro-rmPR3 oder rmPR3 auf Serinproteasen mit Elastase-ähnlicher Substratspezifität beschränkt ist, wurde pro-rmPR3 mit humanem Cathepsin G (Calbiochem), der dritten Serinprotease azurophiler Granula, getestet. Es konnten jedoch keine Spaltfragmente detektiert werden (nicht gezeigt; ein Aktivitätstest wurde nicht durchgeführt).

Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, daß die gespaltene Form von rmPR3 und auch dessen Zymogen katalytisch aktiv ist. Da mit den handelsüblichen chromogenen Substraten die katalytische Aktivität von PR3 und NE nicht unterschieden werden kann, wurde hNE kovalent an feste Sepharosematrix gekoppelt, um sie nach erfolgter Inkubation aus dem Reaktionsgemisch entfernen zu können. Die Sepharosesuspension wurde schließlich eine Stunde mit pro-rmPR3 inkubiert (hierzu die Sepharosesuspension zu gleichen Teilen mit pro-rmPR3 (8,6µg/ml) in 0,1M Tris-HCl pH8,1, 50mM NaCl gemischt) und anschließend abgefiltert. Im Überstand ließ sich nach Inkubation über Nacht mit Substratpuffer schwache katalytische Aktivität nachweisen (durchschnittliche OD_{405nm} des Überstandes: 0,179; Pufferkontrolle: 0,069; Messung jeweils in Triplikaten des 1:4 in Substratpuffer verdünnten Reaktionsansatzes, Standardabweichung 0,002 bzw. 0,004).

In einem Kontrollexperiment wurde gezeigt, daß diese Aktivität nicht von hNE herrührt, die sich während der Inkubation eventuell von der Sepharosematrix ablösen könnte. Hierzu wurde hNE-gekoppelte Matrix wie oben beschrieben aber ohne pro-rmPR3 inkubiert. Während der Nachweis enzymatischer Aktivität der immobilisierten hNE mit Substratpuffer gelang (Ergebnis wurde nicht quantitativ ausgewertet), ließ sich im Überstand keine Aktivität messen (OD_{405nm} des Überstandes: 0,070; Pufferkontrolle: 0,069). Daß eine mögliche Verunreinigung von hNE mit Cathepsin C für die Zymogen-Aktivierung verantwortlich ist, ist unwahrscheinlich: Der eingesetzte Inkubationspuffer besaß einen pH-Wert von 8,1, bei dem Cathepsin C kaum Dipeptidyl-Peptidase sondern vorwiegend Transferase-Aktivität besitzt [219]. Zudem weist Cathepsin C in Abwesenheit von reduzierenden Sulfhydryl-Verbindungen nur geringe katalytische Aktivität auf [327].

Die geringe katalytische Aktivität des Zentrifugationsüberstandes läßt vermuten, daß die Effizienz der hNE-vermittelten Aktivierung in diesem Versuchssystem offenbar niedrig ist. So konnten im SDS-Polyacrylamidgel auch keine Spaltfragmente im Reaktionsüberstand nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Eine Optimierung der Versuchbedingungen ist deshalb notwendig, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit aber nicht durchgeführt.

4.6 Generierung eines mPR3-Antikörperspiegels in Wildtyp-Mäusen

Um einen hinreichenden mPR3-Antikörperspiegel unter Umgehung der immunologischen Toleranz in WT-Mäusen zu erzeugen, wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt:

1. Transfer von Antikörper-sezernierenden Zellen von immunisierten PR3/NE-defizienten Mäusen auf kongene WT-Tiere.
2. Transfer von Antiserum immunisierter PR3/NE-defizienter Mäuse auf kongene WT-Tiere.

Zu diesem Zweck wurden zunächst PR3/NE-defiziente Mäuse mit rmPR3 oder pro-rmPR3 immunisiert und der Erfolg durch eingehende Analyse des gewonnenen Antiserums kontrolliert (Kap. 4.6.1, 4.6.2, 4.6.3). In Kap. 4.6.5 sind die alternativen Vorgehensweisen zur Übertragung der Immunität von PR3/NE-defizienten Mäusen auf Wildtyp-Tiere dokumentiert.

4.6.1 Immunisierung von PR3/NE-defizienten Mäusen mit rmPR3

Da das Epitopspektrum des Zymogens und der reifen Form von humaner PR3 vermutlich nicht identisch ist [302], wurden PR3/NE-defiziente Mäuse mit der Proform und alternativ mit der N-terminal prozessierten Form von rmPR3 immunisiert. Die Applikation von rekombinantem Protein (jeweils ca. 5µg) erfolgte subkutan als Öl-Wasser-Emulsion. Um den Erfolg der Immunisierung zu überprüfen, wurde den Mäusen vor der ersten Injektion ca. 100µl Blut aus der Schwanzvene entnommen. Weiterhin wurde 12 Tage nach der ersten Auffrischungsimmunisierung und 12 und 19 Tage nach der zweiten Auffrischungsimmunisierung Blut entnommen. Das nach der Immunisierung gewonnene Serum von 6-9 Tieren wurde gepoolt und dessen PR3-Antikörperspiegel mit Hilfe eines Festphasenimmunoassays (ELISA) bestimmt. Mit dieser Methode wurden Seren mit einem rmPR3-spezifischen Antikörperspiegel von ca. 1:7000 (pro-rmPR3-Antiserum) bzw. 1:300 (rmPR3-Antiserum) hergestellt (Abb. 4.14). Beide Seren wiesen ähnlich hohe Reaktivität gegenüber pro-rmPR3 auf (nicht gezeigt). Mit den gewonnenen Antiseren ließ sich also pro-rmPR3 und rmPR3 nicht diskriminieren. Um beide Seren zu unterscheiden wird im folgenden der Terminus pro-rmPR3-Antiserum trotz dessen starker Kreuzreaktivität mit rmPR3 verwendet. Da für die Überprüfung der Spezifität der Antiseren in den folgenden Analysen nur PR3/NE-defiziente Mäuse zur Verfügung

standen, wurde eine mögliche Kreuzreaktivität mit muriner NE unter Verwendung eines hNE-spezifischen Festphasenimmunoassays getestet. Es wurde keine IgG-Bindung bei Verdünnungen von 1:7000 (pro-rmPR3-Antiserum) bzw. 1:300 (rmPR3-Antiserum) beobachtet (nicht gezeigt). Murine NE stand für diese Untersuchung nicht zur Verfügung, aufgrund der hohen Homologie zwischen mNE und hNE kann aber eine Kreuzreaktivität der Antiseren mit mNE nahezu ausgeschlossen werden.

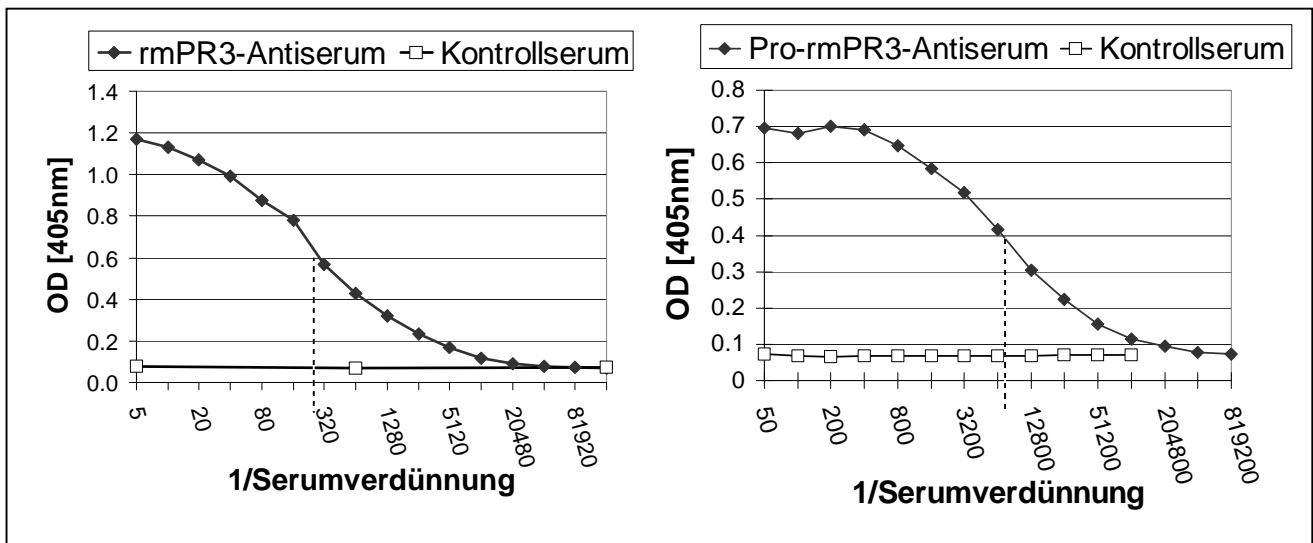


Abb. 4.14: Festphasenimmunoassay: Bestimmung des rmPR3-spezifischen Antikörperspiegels (IgG) der gewonnenen Antiseren

Die Antiseren wurden in einer Verdünnungsreihe von 1:50 bis 1:819200 (pro-rmPR3-Antiserum) bzw. von 1:5 bis 1:81920 (rm-PR3-Antiserum) in rmPR3-adorbierten 96-Napf-Platten gemessen. Der Wendepunkt des jeweiligen Graphen wurde abgeschätzt und auf die x-Achse interpoliert (gestrichelte Linien); Der IgG-Antikörperspiegel wurde so für pro-rmPR3-Antiserum auf 1:7000, der für rmPR3-Antiserum auf 1:300 geschätzt. Kontrollserum (Kap. 3.21.1) wurde als Negativprobe eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) in Duplikaten bei 405nm.

Um zu prüfen, ob immunologische Toleranz bei Wildtyp-Mäusen auch gegenüber rekombinant hergestellter pro-mPR3 besteht, wurden diese in gleicher Weise mit pro-rmPR3 behandelt. Ein signifikanter Antikörperspiegel konnte jedoch nicht detektiert werden (nicht gezeigt). Dieser Befund weist darauf hin, daß das rekombinant hergestellte Zymogen ein ähnliches Epitopspektrum wie natürliche mPR3 aufweist.

Immunisierte PR3/NE-defiziente Mäuse wurden selbst nicht auf Symptome der WG untersucht, da ein spezifischer, pathologischer Befund nicht zu erwarten war.

4.6.2 Bestimmung der Spezifität des gewonnenen Antiserums

a) *Western Blot*-Analyse

Die für die Diagnose einer WG relevanten Laborparameter sind sowohl ein PR3-spezifischer Antikörperspiegel von mind. 1:20 im Festphasenimmunoassay (ELISA) als auch ein positiver IFT (Immunfluoreszenztest, Kap. 1.2). Patientenserum entzieht sich in der Regel allerdings aufgrund der Labilität konformationeller Epitope einer Analyse durch *Western Blotting*. RmPR3- und pro-rmPR3-Antiserum erkennen hingegen auch lineare Epitope (Abb. 4.15).

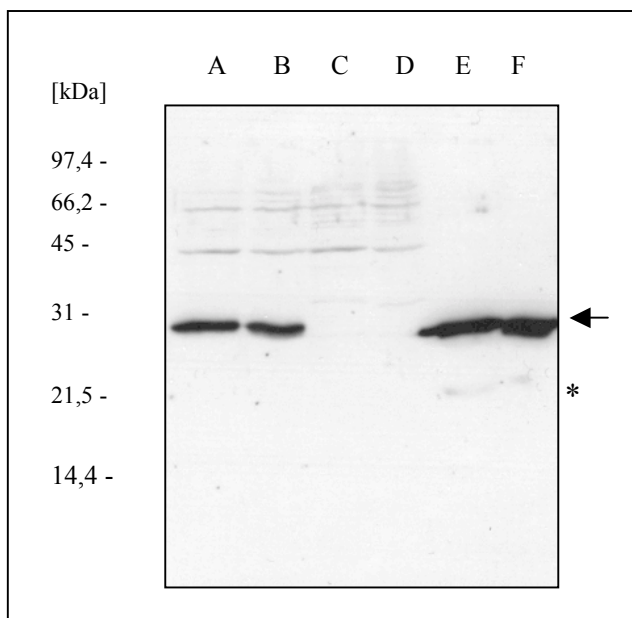


Abb. 4.15: Western Blot

Mit rmPR3-Antiserum (1:100 verdünnt) läßt sich mPR3 in Maus-Neutrophilenlysate (A unter reduzierenden Bedingungen, B unter nicht reduzierenden Bedingungen) nachweisen. In PR3/NE-defizienten Neutrophilen fehlt die entsprechende Bande (C reduzierend, D nicht reduzierend). rmPR3 wird ebenfalls erkannt (E reduzierend, F nicht reduzierend). Mit pro-rmPR3-Antiserum wurde ein identisches Ergebnis erzielt (nicht gezeigt). Die Position von mPR3 ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

* (für E/F) 20kDa Spaltfragment von rmPR3 (Beschreibung s.Kap. 4.5.2)

b) Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Die Methode der indirekten Immunfluoreszenzfärbung von neutrophilen Granulozyten erlaubt in der klinischen Anwendung die Diskriminierung von Autoantikörpern, die gegen unterschiedliche Bestandteile der Neutrophilen gerichtet sind. Sie werden aufgrund des Färbemusters auf Formaldehyd- und Äthanol-fixierten Neutrophilen-Präparaten identifiziert (Abb. 4.16).

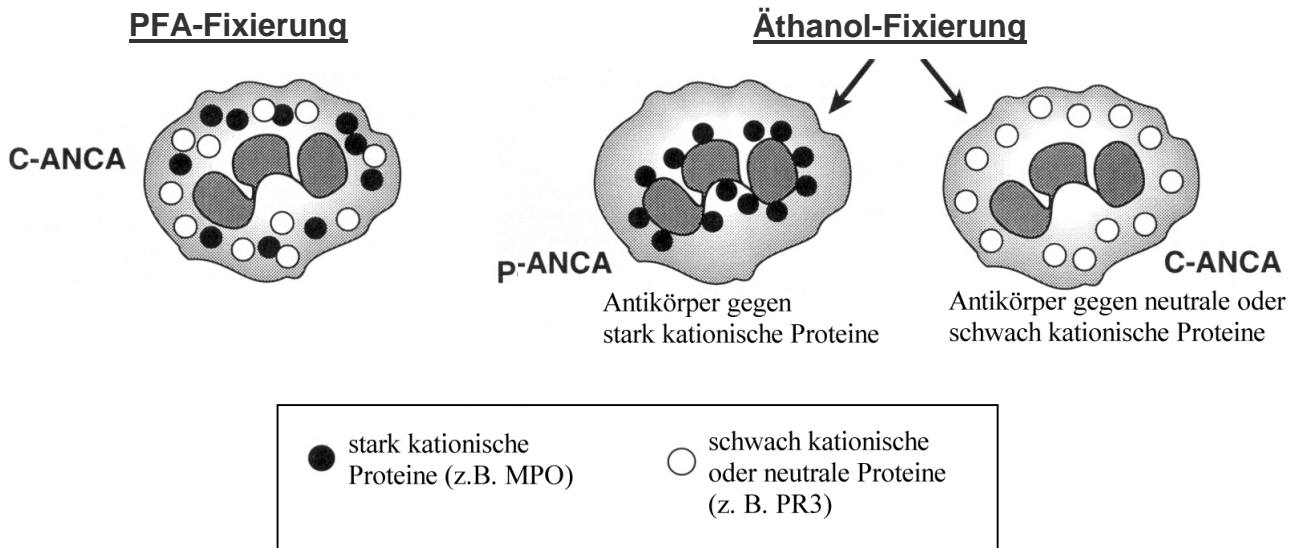


Abb. 4.16: Die Verwendung vernetzender Fixative (Paraformaldehyd links, Äthanol-Fixierung rechts) für die Präparation der Zellen führt zu einer Immobilisierung der ANCA-relevanten Antigene im Zytoplasma.

Das p-ANCA-Muster stellt hingegen ein artifizielles Färbemuster dar: die Äthanol-Fixierung führt zu Veränderungen in den Granula-Membranen, was eine ionische Wechselwirkung zwischen kationischen Proteinen der Granula und der negativ geladenen Zellkernmembran ermöglicht. Antikörper gegen stark kationische Proteine liefern auf PFA-fixierten Granulozyten ein zytoplasmatisches Färbemuster, auf Äthanol-fixierten Zellen hingegen perinukleäre Färbung. Mit PR3-spezifischen Antikörpern wird mit beiden Methoden zytoplasmatische Färbung erzielt. In der klinischen Diagnose wird diese Eigenschaft zur Unterscheidung von PR3-Antikörpern und Antikörpern, die gegen Myeloperoxidase (MPO), Cathepsin G, Lactoferrin und andere kationische Autoantigene gerichtet sind, genutzt. PFA-fixierte Zellen erlauben hingegen eine Unterscheidung von ANCA und ANA (*anti nuclear antibodies*). ANA, die gegen Bestandteile des Zellkerns, z. B. DNA gerichtet sind, rufen mit beiden Fixierungsmethoden eine Färbung des Zellkerns hervor. Abbildung verändert aus [148].

Eine eindeutige Bestimmung ist in der klinischen Diagnose unerlässlich, da unterschiedliche Antikörperklassen (c-ANCA, p-ANCA, ANA) manchmal gleichzeitig auftreten [148]. Da die unterschiedlichen Antikörperklassen verschiedenen Autoimmunerkrankungen zugeordnet werden, ist deren Identifizierung und genaue Differenzierung wichtig für die Diagnose und Behandlung des Patienten. Eine simultane Analyse des Färbemusters wurde für das pro-rmPR3- und rmPR3-Antiserum nicht durchgeführt, da Äthanol-fixierte und mit pro-rmPR3- bzw. rmPR3-Antiserum gefärbte Maus-Neutrophile nicht das erwartete zytoplasmatische Färbemuster aufwiesen (nicht gezeigt). Offensichtlich wird mPR3 bei der Fixierung durch Alkohol nicht ausreichend immobilisiert und bei

den anschließenden Inkubationsschritten ausgewaschen (ebenfalls beobachtet von Specks, U., persönliche Mitteilung). Mit pro-rmPR3-Antiserum-gefärbte, Paraformaldehyd-fixierte neutrophile Granulozyten der Maus zeigten indes eine deutliche, granulär akzentuierte Färbung des Zytoplasmas. Die Überprüfung der Spezifität erfolgte durch Färbung von mPR3/mNE-defizienten Zellen mit dem gleichen Antiserum und Färbung von Wildtyp-Zellen mit Präimmunsrum (Abb. 4.17). Mit rmPR3-Antiserum wurde, vermutlich wegen des niedrigeren Antikörperspiegels, keine Färbung erzielt. Geringere Serumverdünnungen von 1:20 (gegenüber 1:250 bei pro-rmPR3-Antiserum) führten bereits zu einer starken Hintergrundfärbung, die die eindeutige Identifizierung PR3-spezifischer Signale verhinderte.

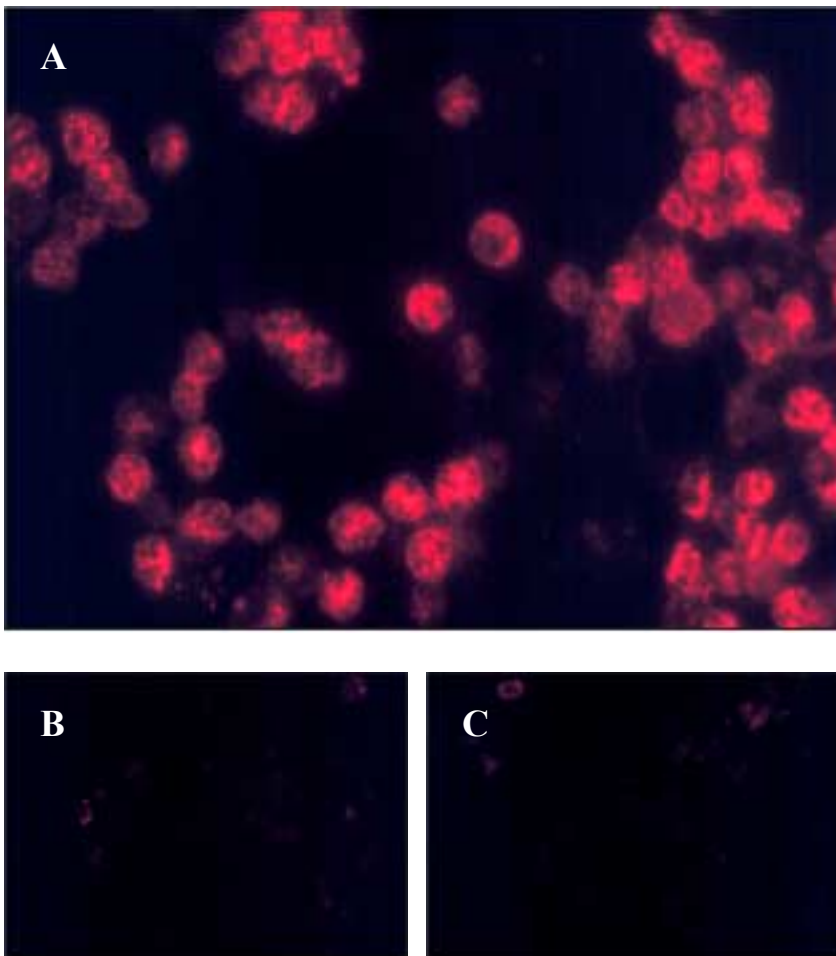


Abb. 4.17: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Peritonealzellen.

Peritonealexsudat mit überwiegend neutrophilen Granulozyten, Sekundärantikörper: Ziege anti-Maus-Cy3; alle getesteten Seren 1:250 verdünnt; 640fach Originalvergrößerung.

A: Wildtyp-Zellen, gefärbt mit pro-rmPR3-Antiserum; es sind stabkernige (Pfeilspitze) und polymorphkernige (Pfeil) neutrophile Granulozyten zu erkennen; die zytoplasmatische Färbung erscheint granulär, der Kern bleibt ausgespart.

B: Wildtyp-Zellen, gefärbt mit Präimmunsrum

C: PR3/NE-defiziente Zellen, gefärbt mit pro-rmPR3-Antiserum

Die Zellpräparate B und C zeigen keine Signale und beweisen somit die Spezifität der Färbung für mPR3.

4.6.3 IgG aus pro-rmPR3- und rmPR3-Antiserum binden an oberflächenexponierte PR3-Epitope

Eine nach dem vorgeschlagenen Modell (Kap. 5.5) für die pathogene Wirkung von PR3-Antikörpern unerläßliche Eigenschaft ist die Spezifität für PR3-Epitope, die auf der Oberfläche von stimulierten Neutrophilen exponiert sind. Zur Gewinnung stimulierter Neutrophiler wurde bei einer WT-Maus und einer PR3/NE-defizienten Kontrollmaus durch Injektion von Casein (i.p.) eine Peritonitis ausgelöst. Die infiltrierenden Zellen wurden isoliert, Granulozyten über einen kontinuierlichen Dichtegradienten angereichert und die Bindung von mPR3-Antikörpern auf der Zelloberfläche mit Hilfe von Flußzytometrie gezeigt. Die Spezifität für mPR3 wurde durch Färbung mit Kontrollserum (Kap. 3.21.1) und Färbung von PR3/NE-defizienten Zellen mit dem gleichen Antiserum nachgewiesen (Abb. 4.18).

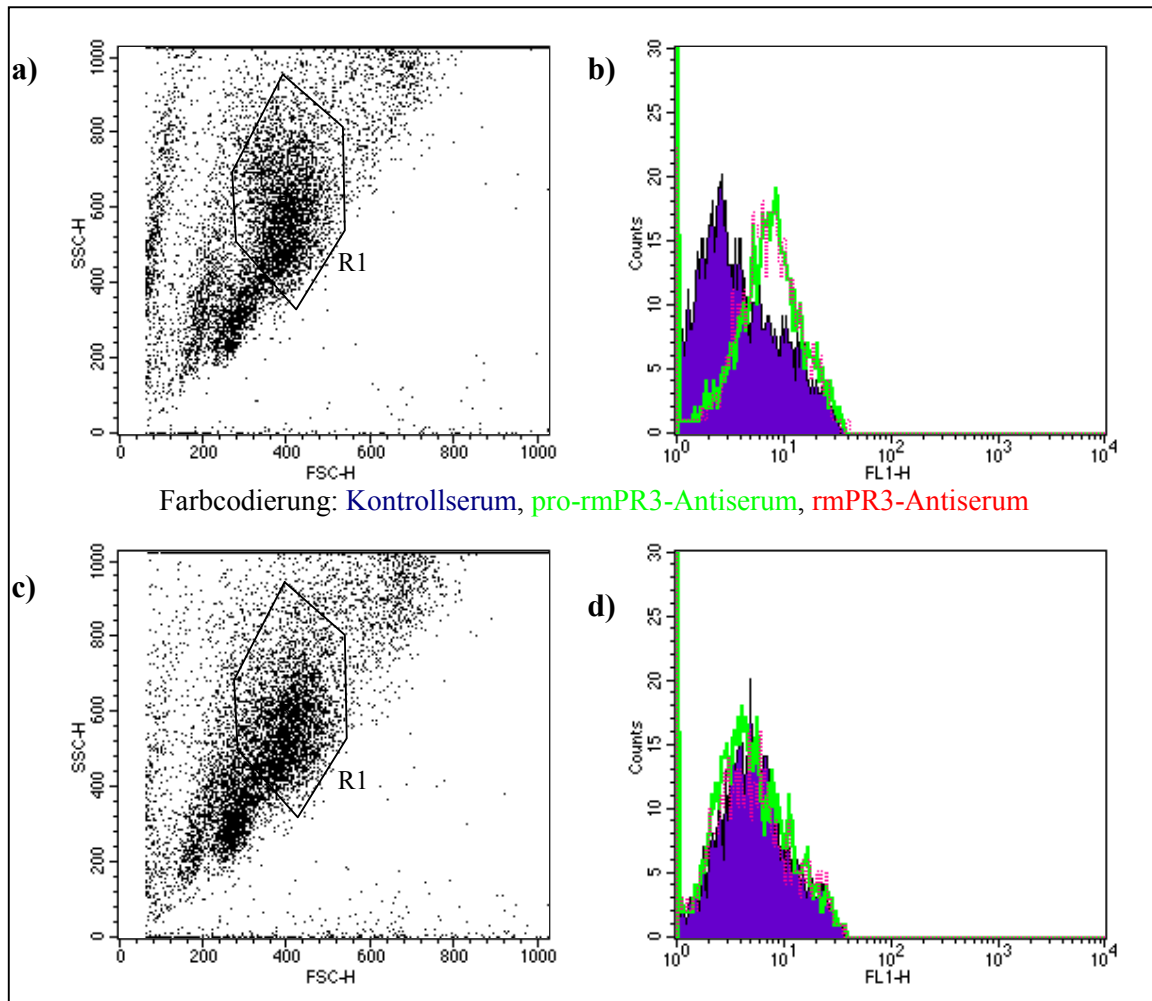


Abb. 4.18: Durchflußzytometrischer Nachweis von Antikörperbindung an oberflächenexponierte PR3-Epitope auf Maus-Granulozyten.

Unspezifische Bindung von Immunglobulinen wurde durch Präinkubation von Peritonealzellen mit Mausserum und anschließend mit unmarkiertem Ziege-Anti-Maus-IgG ($F(ab')_2$) reduziert. Danach wurden die Peritonealzellen mit den Testseren (pro-rmPR3- bzw. rmPR3-Antiserum, Kontrollserum, 1:20 verdünnt) eine Stunde auf Eis inkubiert und gebundene IgG mit FITC-gekoppeltem Ziege-Anti-Maus-IgG ($F(ab')_2$) detektiert. Tote Zellen wurden durch Propidiumiodid-Gegenfärbung von der Messung ausgeschlossen.

a) (Wildtyp), c) (PR3/NE-defizient) Granulozyten wurden im Streulichtdiagramm identifiziert (Kasten R1).

b) Fluoreszenzintensität (FL1-H) der Zellen aus R1 in a). Die erhöhte Fluoreszenzintensität Antiserum-behandelter Peritonealzellen gegenüber Kontrollserum-behandelten Zellen beweist spezifische Bindung von IgG an Granulozyten.

d) Fluoreszenzintensität (FL1-H) der Zellen aus R1 in c). Auf PR3/NE-defizienten Peritonealneutrophilen ist keine IgG-Bindung nachweisbar.

4.6.4 Pro-rmPR3-Antiserum induziert keinen nachweisbaren “oxidativen burst” neutrophiler Granulozyten

Eine wichtige Eigenschaft von PR3-spezifischen Antikörpern ist die Fähigkeit, Zytokin-stimulierte neutrophile Granulozyten zu aktivieren [96]. Ein meßbarer Parameter dieses Aktivierungsprozesses (“oxidativer burst”) ist die Freisetzung reaktiver Sauerstoffintermediate (“ROI”, *reactive oxygen intermediates*). Während des “oxidativen bursts” reduziert die Plasmamembran-gebundene NADPH-Oxidase molekularen Sauerstoff zu Superoxid, das wiederum als Edukt für eine Reihe verschiedener reaktiver Sauerstoffverbindungen wie Wasserstoffperoxid, Hypochlorid und anderen dient. In das Medium freigesetztes Superoxid kann durch die Reduktion von Zytochrom C experimentell quantifiziert werden [206]. Der intrazelluläre Anteil oxidativer Sauerstoffverbindungen kann durch die Oxidation des fluorogenen Farbstoffs Dihydrorhodamin quantitativ im Durchflußzytometer bestimmt werden [86].

1. Messung von freigesetztem Superoxid aus neutrophilen Granulozyten

Stimulierte neutrophile Granulozyten wurden nach einer Casein-induzierten Peritonitis aus der Peritonealhöhle gewonnen und durch Percoll-Dichtezentrifugation angereichert. Die Zellen wurden dann in einer Zytochrom C-Lösung zusammen mit den Testseren inkubiert. Der Verlauf der Aktivierung wurde durch wiederholte Messung bei 550nm in regelmäßigen Intervallen über 2 Stunden verfolgt. Als Positivkontrolle wurden PMA-aktivierte Zellen verwendet. Als Negativkontrollen wurden NE/PR3-defiziente Zellen und Kontrollserum eingesetzt. Aus Abb. 4.19 geht hervor, daß die Inkubation von Granulozyten mit rmPR3- oder pro-rmPR3-Antiserum nicht zu einer detektierbaren Freisetzung von Superoxid führt. Die Positivkontrolle beweist außerdem, daß der Aktivierungsweg über NADPH-Oxidase in NE/PR3-defizienten Zellen nicht gestört ist.

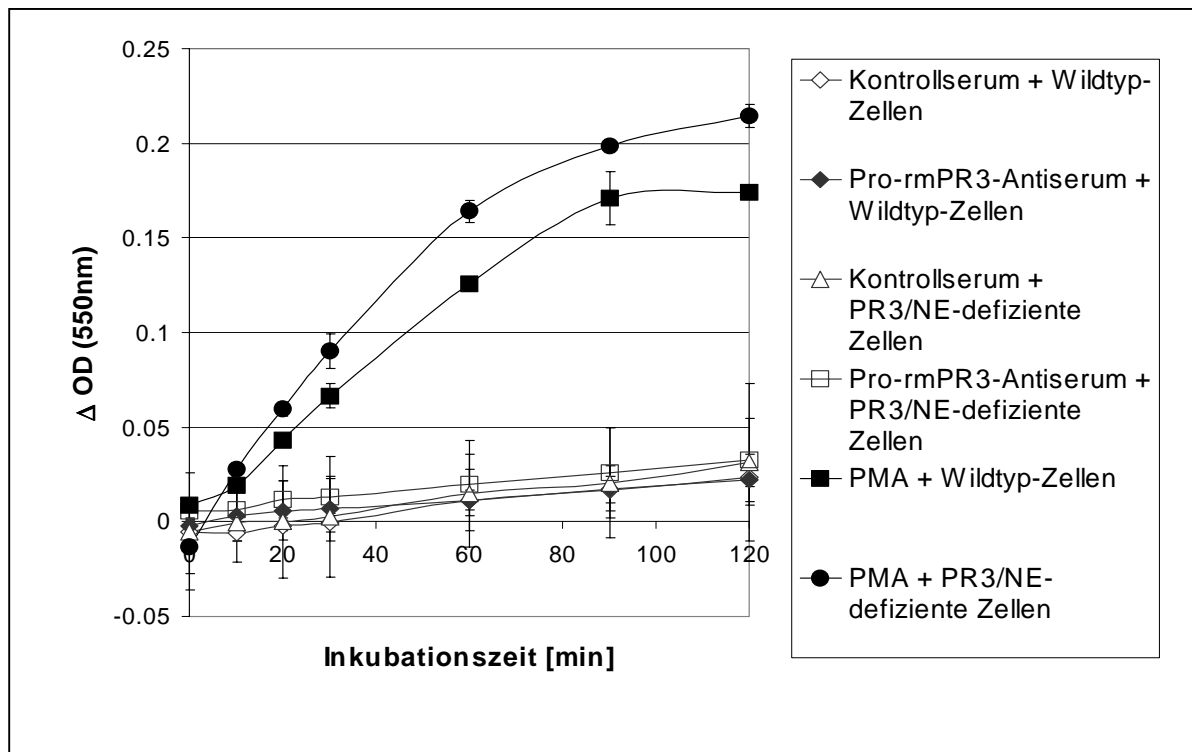


Abb. 4.19: SOD-inhibierbare Reduktion von Zytochrom C

Pro-rmPR3-Antiserum führt nicht zur Freisetzung von Superoxid aus neutrophilen Granulozyten. Wildtyp- und PR3/NE-defiziente neutrophile Granulozyten setzen etwa die gleiche relative Menge Superoxid nach PMA-Stimulation frei. Die relative Superoxidmenge ist auf der y-Achse als Differenz zwischen der optischen Dichte der gemessenen Probe und einer SOD-inhibierten Referenzprobe dargestellt (s. auch Kap. 3.33.2). Die Messung erfolgte jeweils in Duplikaten. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der gemessenen Werte dar.

2. Quantitative Bestimmung intrazellulärer oxidativer Sauerstoffverbindungen

Um das unerwartete Ergebnis des vorangegangenen Experiments zu überprüfen, wurde ein weiterer Parameter des "oxidative burst" bestimmt: die intrazellulären oxidativen Sauerstoffverbindungen, die während der Aktivierung gebildet werden, oxidieren den passiv aufgenommenen fluorogenen Farbstoff Dihydrorhodamin 123 zu fluoreszentschem Rhodamin. Der Aktivierungsvorgang kann damit fluoreszenzzytometrisch gemessen werden.

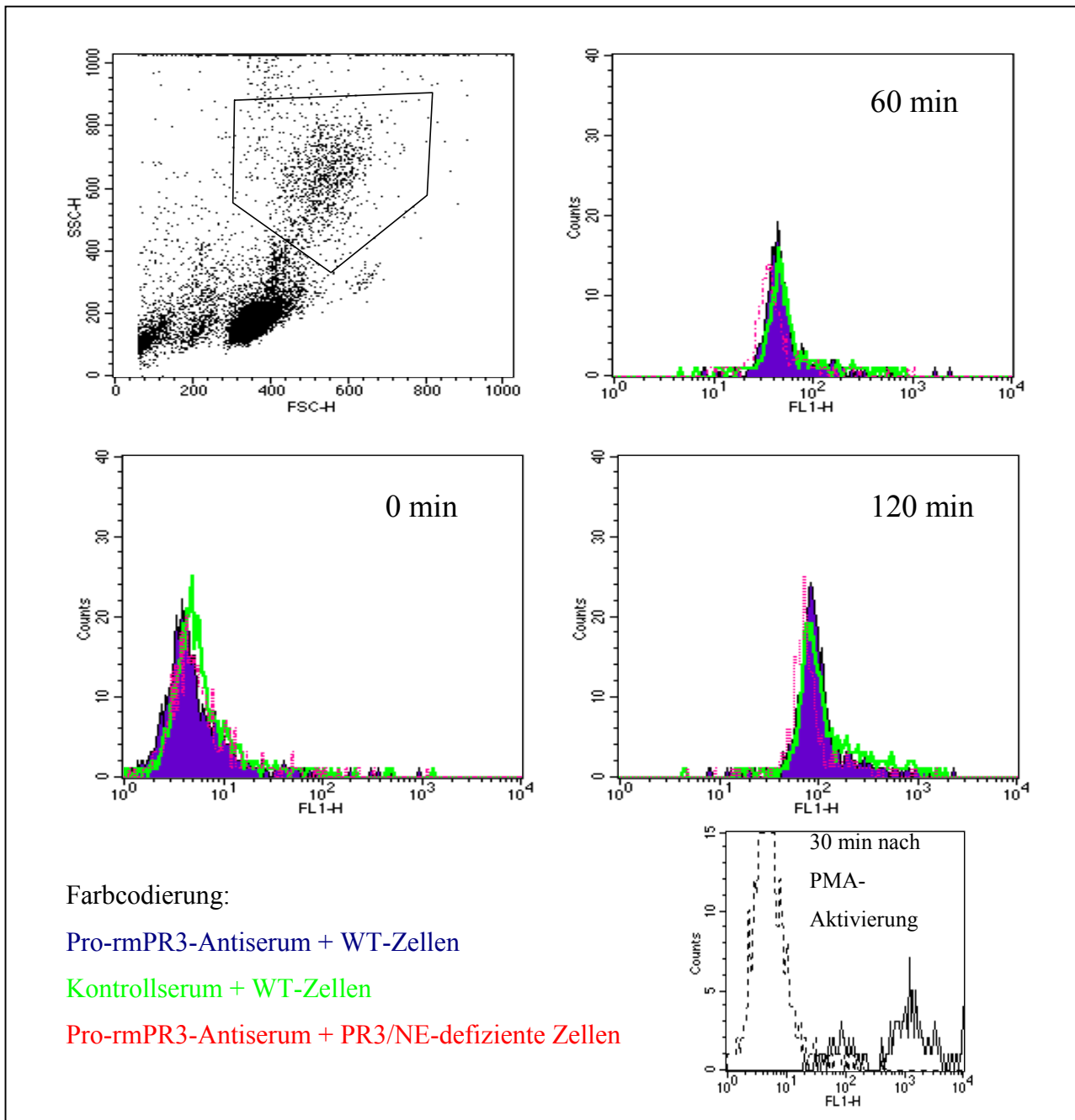


Abb. 4.20: Flußzytometrische Quantifizierung intrazellulärer, reaktiver Sauerstoffintermediate in neutrophilen Granulozyten

TNF α -stimulierte Leukozyten aus peripherem Blut wurden für 120 Minuten bei 37°C mit 2 μ M Dihydrorhodamin 123 und Testseren (1:50 verdünnt) inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die Fluoreszenzintensität von neutrophilen Granulozyten bestimmt.

Oben links: neutrophile Granulozyten wurden im Streulichtdiagramm identifiziert (Kasten).

Histogramme: die Fluoreszenzintensität (FL1-H) neutrophiler Granulozyten nimmt im Verlauf der Inkubation zu, ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Testkombinationen war jedoch während des gesamten Beobachtungszeitraums nicht festzustellen. Als Positivkontrolle wurden PMA-stimulierte Zellen verwendet, die nach 60 Minuten wegen Autolyse nicht mehr meßbar waren (Abb. unten rechts WT-Zellen: gestrichelte Linie=Pufferkontrolle). Weitere Erläuterungen im Text und in Kap. 3.33.

Da im Durchflußzytometer Granulozyten anhand ihrer Streulichtcharakteristik identifiziert werden können, konnte dieser Versuch auch mit peripheren Blutzellen durchgeführt werden. Eine Anreicherung der Granulozyten war nicht erforderlich.

Zunächst wurde Wildtyp-Mäusen Blut entnommen und die Leukozyten isoliert. Nach Stimulation mit TNF α und nach Zugabe von Dihydrorhodamin 123 und pro-rmPR3- oder rmPR3-Antiserum wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und sofort im Durchflußzytometer analysiert. Als Negativkontrollen wurde Kontrollserum (Kap. 3.21.1) mit Wildtyp-Zellen und pro-rmPR3-Antiserum mit PR3/NE-defizienten Zellen eingesetzt. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied der Fluoreszenzintensität zwischen Negativkontrollen und der Testproben detektiert werden (Abb. 4.20). Das gleiche Ergebnis wurde mit Peritonealzellen und mit rmPR3-Antiserum erzielt (nicht gezeigt).

Die Positivkontrolle mit PMA-aktivierten Zellen ist für die einzelnen Entnahmezeitpunkte nicht dargestellt, da nach 60 Minuten PMA-Stimulation die Granulozytenpopulation anhand des Streulichtdiagramms nicht mehr zu identifizieren war. Nach 30 Minuten wies die Granulozytenpopulation eine durchschnittliche Fluoreszenzintensität von ca. 10^3 auf (Abb. 4.20 unten rechts). Dieses Ergebnis beweist die hohe Sensitivität des Testsystems. Angesichts der für humane Granulozyten beschriebenen c-ANCA-vermittelten Aktivierungskinetik wäre allerdings eine schwächere und vor allem später einsetzende Aktivierung mit pro-rmPR3-Antiserum zu erwarten gewesen [96]. Da aber in einem Beobachtungszeitraum von 120 Minuten keinerlei Unterschiede zwischen Kontroll- und Testansätzen zu erkennen war und bei gleicher Serumkonzentration IgG-Bindung auf der Oberfläche von Neutrophilen nachgewiesen werden konnte (Kap. 4.6.3), findet offensichtlich keine Aktivierung durch pro-rmPR3-Antiserum *in vitro* statt.

4.6.5 Übertragung der Anti-mPR3-Immunität von PR3/NE-defizienten Mäusen auf kongene Wildtyp-Tiere

In den folgenden Experimenten wurde auf PR3/NE-defiziente Mäuse als Serumrezipienten verzichtet, da beide Serinproteasen inflammatorische Prozesse über verschiedene Wirkmechanismen (z. B. Modulation der Aktivität von Zytokinen) stark beeinflussen können (Kap. 1.5, Zusammenfassung in [11]). Die Ergebnisse aus Kap. 4.3 bestätigen, daß die Intensität einer akuten inflammatorischen Reaktion PR3/NE-defizienter Mäuse nicht mit der von Wildtypmäusen vergleichbar ist. Für eine geeignete Kontrolle müßte zudem gewährleistet sein, daß die bisher nicht aufgeklärten ANCA-vermittelten Aktivierungswege auch bei PR/NE-defizienten neutrophilen Granulozyten intakt sind.

1. Transfer von Antikörper-sezernierenden Zellen von immunisierten PR3/NE-defizienten Mäusen auf kongene Wildtyp-Tiere

Slifka bzw. Manz konnten durch den Transfer von Knochenmarkszellen Ovalbumin- bzw. LCMV (*lymphocytic choriomeningitis virus*)-immunisierter Mäuse auf naive Rezipienten zeigen, daß humorale Immunität antigenunabhängig zwischen Individuen übertragen werden kann [200, 284]. Die konstitutive Sekretion von Antikörpern durch T-Zell-unabhängige sog. „langlebige Plasmazellen“ im Knochenmark gewährleistet einen stabilen Antikörperspiegel über mehrere Wochen und Monate.

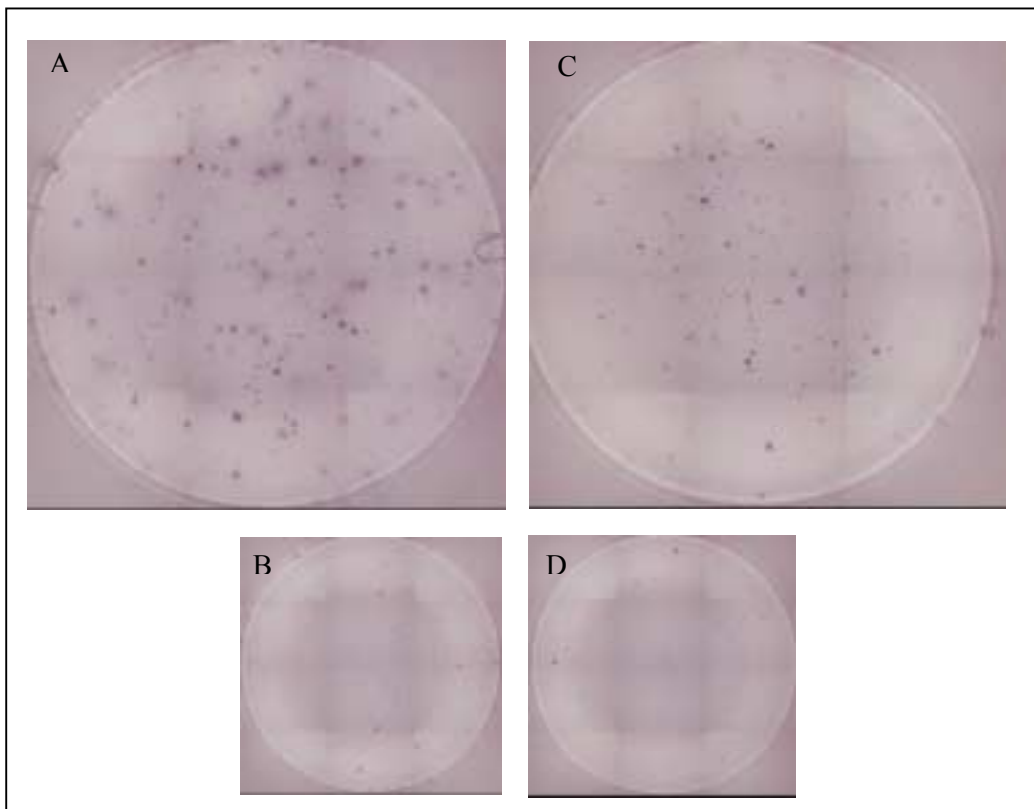


Abb. 4.21: ELISPOT

Bestimmung der Anzahl Ovalbumin-Antikörper-sezernierender Plasmazellen im Knochenmark Ovalbumin-immunisierter Mäuse. Eine 96-Napf-Platte mit Nitrozelluloseboden, an den zuvor Ovalbumin adsorbiert wurde, wurde über Nacht mit Knochenmarkszellen inkubiert. Antikörper, die an das immobilisierte Ovalbumin am Napfboden binden, wurden mit einem AP-konjugierten Ziege-Anti-Maus-Ig-Antikörper sichtbar gemacht (Negativkontrolle ohne Ovalbuminadsorption, C). Positive Signale sind durch ihre kreisrunde Form und gelegentlich durch „Höfe“ gekennzeichnet (A). Als weitere Negativkontrollen wurden Knochenmarkszellen einer nicht immunisierten Maus (B) oder Puffer (D) eingesetzt. Es wurden nur solche Punkte als positiv bewertet, wenn deren Form, Farbintensität und Größe nicht mit Signalen in den Negativkontrollen übereinstimmte. Zur Berechnung der Plasmazellzahl wurden 100µl der Suspensionen in Verdünnungen von 1×10^5 bis 1×10^7 /ml (hier gezeigt: 1×10^7 /ml) in Triplikaten eingesetzt und der Durchschnittswert berechnet. Die Auswertung der gezeigten Nöpfe ergab 60 Plasmazellen in 10^6 Knochenmarkszellen. Originalvergrößerung 30-fach.

Andere Arbeiten zeigen außerdem, daß sich durch Knochenmarkstransfer auch B-Zell-vermittelte Autoimmunität auf Mäuse übertragen läßt, die selbst keine Autoimmun-Helfer-Zellen besitzen [37, 176]. Die technische Durchführbarkeit mit den gegebenen Mitteln wurde deshalb zunächst anhand Ovalbumin-immunisierter Mäuse geprüft. Hierzu wurden PR3/NE-defiziente Mäuse wie in Kap. 3.30.1 beschrieben mit 100µg Aluminiumhydroxid-adsorbiertem Ovalbumin immunisiert, der Erfolg der Immunisierung mit Hilfe eines Ovalbumin-spezifischen ELISA (Kap. 3.25) überprüft und nach 3 Monaten femorales Knochenmark gewonnen (1×10^7 - $3,6 \times 10^7$ Knochenmarkszellen pro Maus). Die Zellen wurden anschließend mit dem Zytostatikum Mitomycin C behandelt, um die Proliferation von transferierten Knochenmarkszellen im Rezipienten auszuschließen. Die im Knochenmark enthaltenen Plasmazellen wurden unter Verwendung eines Ovalbumin-spezifischen ELISPOTs (*enzyme linked immunospot assay*, Kap. 3.30.3, Abb. 4.21) quantifiziert. In zwei unabhängigen Experimenten mit 4 bzw. 5 Spendermäusen wurden 20-80 Ovalbumin-Antikörper sezernierende Zellen in 10^6 Knochenmarkszellen detektiert. In Experimenten von Slifka und Mitarbeitern [284] wurden für den adoptiven Transfer von Knochenmarkszellen LCMV-immunisierter Mäuse $1,5 \times 10^4$ antiviraler Plasmazellen in 4×10^7 Knochenmarkszellen eingesetzt. Die vergleichsweise geringe Zahl Ovalbumin-spezifischer Plasmazellen (max. 1500 pro Maus) im gewonnenen Knochenmark der vorliegenden Arbeit ließ daher vermuten, daß die Übertragung ohne vorherige (partielle) Knochenmarksdepletion durch Bestrahlung der Rezipienten keine oder nur sehr geringe spezifische Antikörperspiegel hervorrufen würde. Dennoch wurden auf insgesamt 6 naive kongene Wildtyp-Mäuse Knochenmark mit 30 bis 600 Ovalbumin-Antikörper sezernierenden Plasmazellen übertragen. Es ließen sich 3 Wochen später aber erwartungsgemäß bei keinem Rezipienten Ovalbumin-Antikörper im Serum durch ELISA nachweisen (nicht gezeigt). Dieser methodische Ansatz zur Übertragung von rmPR3-Immunität von PR3/NE-defizienten Mäusen auf Wildtyp-Mäuse wurde daher nicht weiter verfolgt.

2. Transfer von Antiserum immunisierter PR3/NE-defizienter Mäuse auf kongene Wildtyp-Tiere

Richman und Kollegen konnten zeigen, daß die intravenöse Injektion von Anti-*Torpedo* Acetylcholinrezeptor-Antikörpern bei der Ratte Myasthenie-ähnliche Symptome hervorruft [258]. Dieses Beispiel zeigt, daß sich manche Antikörper-vermittelte Pathomechanismen durch Verabreichung autoreaktiver Immunglobuline im Tiermodell simulieren lassen.

Alternativ zur oben beschriebenen Methode wurde deshalb untersucht, ob sich durch regelmäßige Gabe von rmPR3- oder pro-rmPR3-Antiserum von PR3/NE-defizienten Mäusen an kongene

Wildtypmäuse pathologische Veränderungen wie Vaskulitis oder Glomerulonephritis induzieren lassen.

Hierzu wurde wie in Kap. 3.22 beschrieben 6 Wildtyp-Mäusen über einen Zeitraum von 10 Wochen wiederholt pro-rmPR-Antiserum intravenös verabreicht. Zur Bestimmung des Antikörperspiegels wurde den Tieren vor jeder Auffrischungsinjektion Blut entnommen (Abb. 4.22). Nach 10 Wochen wurde die Niere, Lunge und Leber entnommen. Die pathologische Begutachtung der fixierten Organe wurde am Institut für Pathologie der GSF in Neuherberg von Dr. L. Quintanilla-Fend an Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Paraffinschnitten (10 μ m) durchgeführt. Als Kontrolltiere wurden fünf etwa gleichaltrige unbehandelte Mäuse herangezogen.

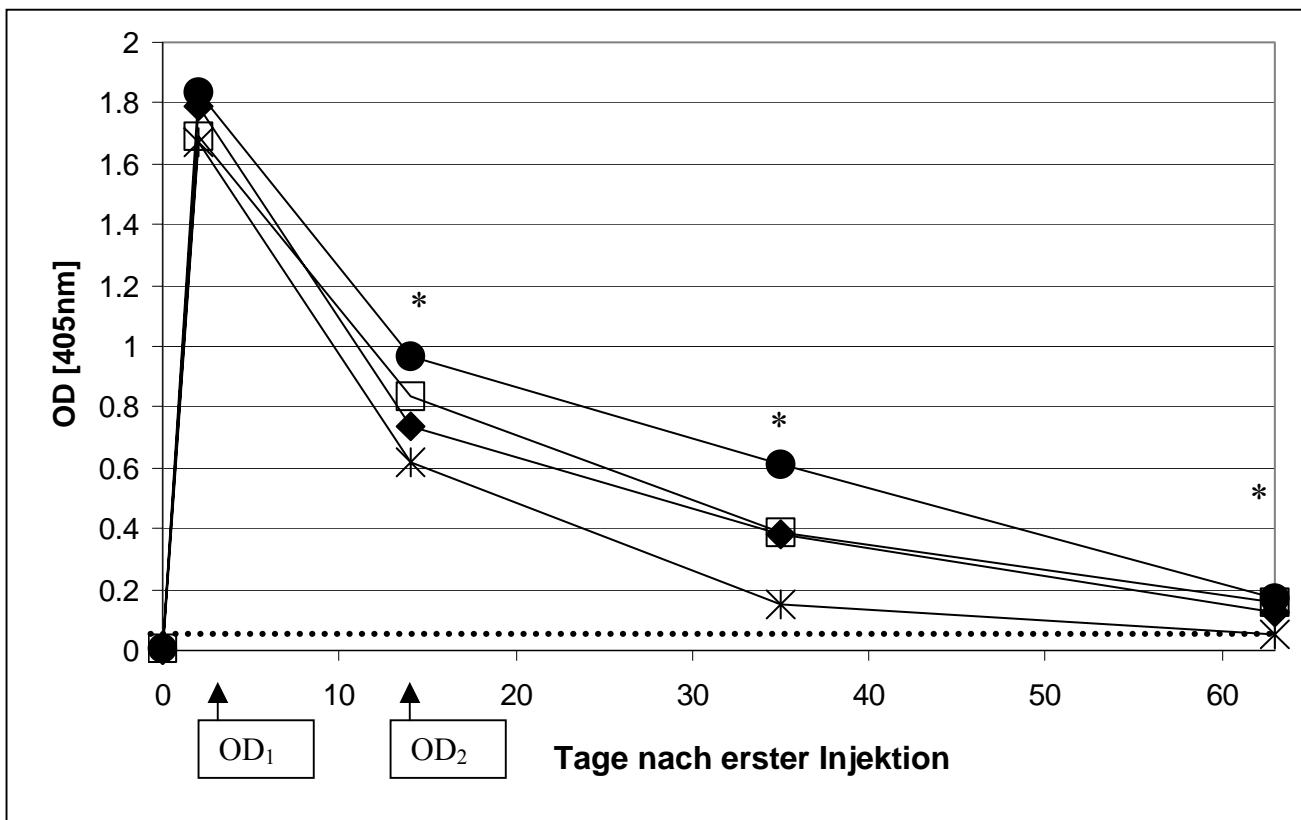


Abb. 4.22: Reaktivität des Serums von 4 passiv immunisierten Mäusen gegen rmPR3 im Festphasenimmunoassay, dargestellt als OD bei 405 nm

Jede Linie repräsentiert die Meßwerte für Anti-rmPR3-spezifische IgG-Spiegel einer einzelnen Maus. Auffrischungsinjektionen (*) wurden 2 Wochen, 5 Wochen und 9 Wochen nach der ersten Injektion (Tag 0) verabreicht, zuvor wurde jeweils eine Blutprobe entnommen. Der dargestellte Verlauf des Antikörperspiegels repräsentiert daher die Minimalwerte über 9 Wochen (Ausnahme: Tag 2=“OD₁“). Über den gesamten Behandlungszeitraum läßt sich ein signifikanter Antikörperspiegel (gepunktete horizontale Linie: zweifacher Wert über Hintergrund) bei einer Verdünnung von 1:2000 nachweisen. Die Zeitpunkte der Serumentnahme für die Halbwertszeitbestimmung sind unter der x-Achse angegeben (OD₁, OD₂; Berechnung siehe Text). Die Messungen erfolgten jeweils in Duplikaten, die eingezeichneten Marken stellen den jeweiligen Durchschnitt beider Messungen dar.

Wie in Abb. 4.22 gezeigt, ließ sich während des gesamten Behandlungszeitraums ein signifikanter rmPR3-Antikörperspiegel bei einer Verdünnung von 1:2000 nachweisen.

Die Elimination von Antikörpern gehorcht einer Kinetik erster Ordnung. Aus den gemittelten Meßwerten von 4 behandelten Mäusen von Tag 2 und Tag 14 ließ sich deshalb durch exponentiale Regression die Plasmahalbwertzeit der transferierten Antikörper errechnen (Anmerkung: Da die in Abb. 4. 22 dargestellten Meßpunkte für OD₁ im nicht linearen Bereich liegen, wurden für die Berechnung Werte herangezogen, die mit dem gleichen Festphasenimmunoassay bei kürzerer Inkubationszeit gewonnen wurden. Zudem wurden die mit Präimmunserum erhaltenen Kontrollwerte abgezogen. Die für die Berechnung zugrunde gelegten Durchschnittsnettowerte OD₁=0,628 und OD₂=0,296 entsprechen daher nicht den in der Abbildung 4.22 gezeigten Meßwerten).

Kinetiken erster Ordnung lassen sich durch die Beziehung ausdrücken:

$$y = y_0 \cdot e^{-k \cdot t}$$

mit y= Konzentration zur Zeit t; y₀= Anfangskonzentration;
k=Eliminationskonstante

Für die Halbwertzeit t_{1/2} gilt entsprechend:

$$\frac{y_0}{2} = y_0 \cdot e^{-k \cdot t_{1/2}}$$

Durch exponentiale Regression erhält man aus den Werten OD₁ und OD₂ folgende Gleichung:

$$\frac{y_0}{2} = 0,628 \cdot e^{-0,0627 \cdot t_{1/2}}$$

Durch beidseitiges Logarithmieren erhält man die Plasmahalbwertzeit der transferierten Antikörper:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} = \frac{0,693}{0,0627} = 11,1$$

Die berechnete durchschnittliche Halbwertzeit rmPR3-spezifischer IgG (11,1 Tage ± 2,2) entspricht recht genau den Werten, die von Slifka und anderen für passiv transferierte LCMV-spezifische IgG in der Maus (11,7 Tage ± 0,5) gefunden wurden [284]. Dieser Befund deutete darauf hin, daß keine spezifische Resorption von PR3-Antikörpern in den Rezipienten stattfand.

Die histopathologische Analyse der Organe lieferte keine eindeutigen Hinweise auf eine autoantikörperabhängige, entzündliche Reaktion in Niere und Lunge. Im folgenden sind die Einzelbefunde der untersuchten Mäuse aufgeführt:

unbehandelte Kontrollmäuse:

| <u>Befund Lunge</u> | | <u>Befund Niere</u> |
|---------------------|-------------------------------|----------------------|
| 1) | Mikrogranulome | normal |
| 2) | Granulome, fokale Vaskulitis | fokale Proliferation |
| 3) | normal | normal |
| 4) | Granulome | normal |
| 5) | vereinzelt pleurale Granulome | normal |

pro-rmPR3-Antiserum-behandelte Mäuse:

| | <u>Befund Lunge</u> | <u>Befund Niere</u> |
|----|---------------------|----------------------|
| 1) | normal | normal |
| 2) | Granulome | fokale Proliferation |
| 3) | normal | fokale Proliferation |
| 4) | normal | fokale Proliferation |
| 5) | normal | fokale Proliferation |
| 6) | Granulome | fokale Proliferation |

Offensichtlich löst die Belastung der Mäuse mit externen Stimuli unter den gegebenen hygienischen Haltungsbedingungen eine lokale Immunreaktion aus, da bei 4 von 5 unbehandelten Kontrollmäusen vereinzelte Granulome in der Lunge gefunden wurden. Bei rmPR3-Antiserum-behandelten Mäusen ließen sich aber weder eine vermehrte Zahl von Granulomen noch Vaskulitis nachweisen (Abb. 4.23). Bei 5 der 6 Antiserum-behandelten Mäuse wurde eine vereinzelte Proliferation von Mesangiumzellen oder Podozyten der Nierenglomeruli („fokale Proliferation“ in obiger Tabelle) diagnostiziert, hingegen wurde diese bei unbehandelten Mäusen nur in einem Fall gefunden. Es konnte anhand der histologischen Präparate allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden, daß die beobachtete Hyperzellularität in den Glomeruli stattdessen von mononukleären Zellinfiltraten herrührt. Da auch bei einer unbehandelten Kontrollmaus pulmonale Granulome und fokale Proliferation in der Niere diagnostiziert wurde, läßt sich nicht eindeutig bestimmen, ob bei Antiserum-behandelten Mäusen eine äußerst schwache Inflammation der Nierenglomeruli vorliegt. Unter den beschriebenen experimentellen Bedingungen ließen sich aber keine pathologischen Veränderungen, die mit der Wegener’schen Trias vergleichbar sind, nachweisen (Abb. 4.23).

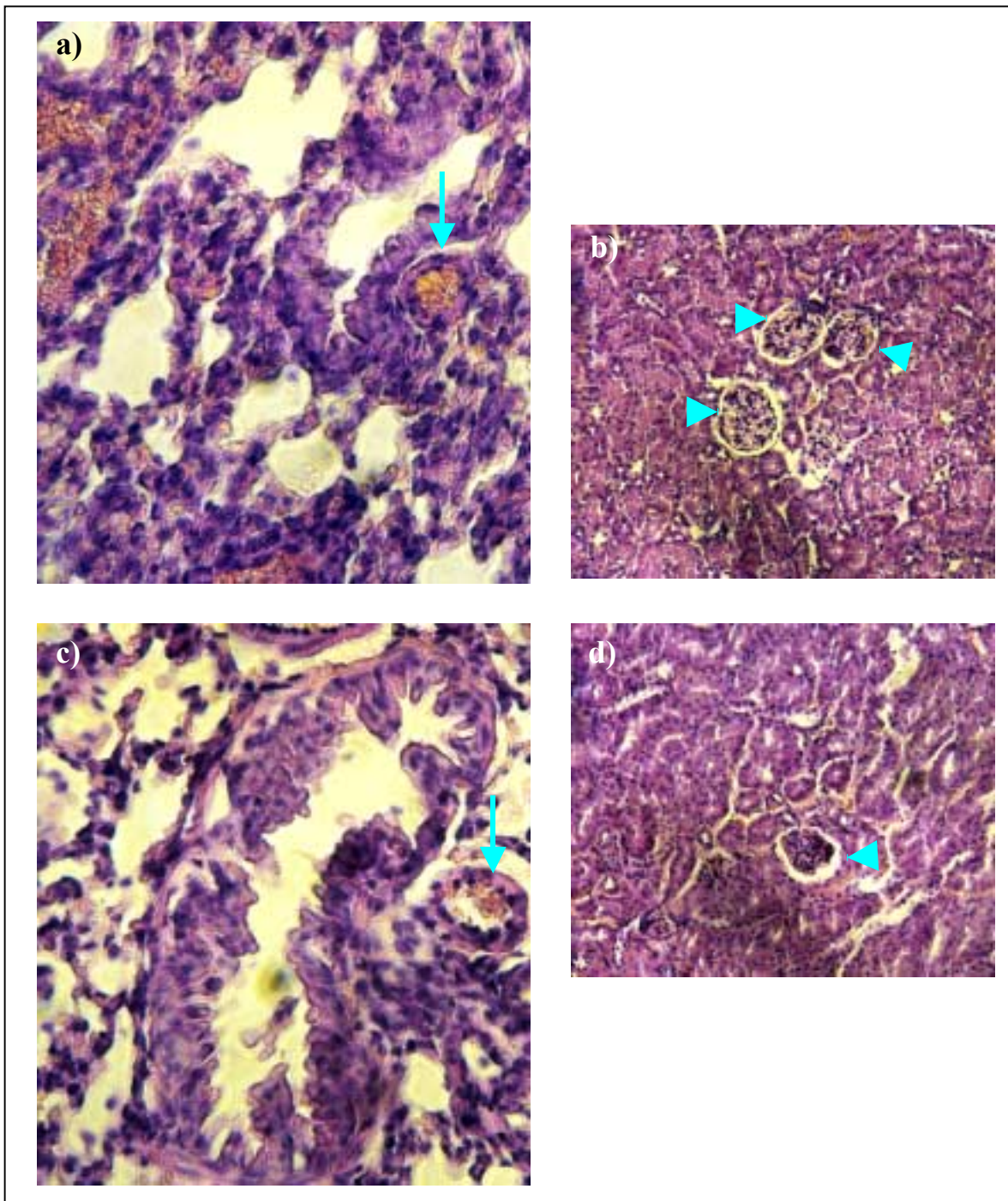


Abb. 4.23: Ausgewählte histologische Präparate von Lunge und Niere pro-rmPR3-Antiserum-behandelter Mäuse und unbehalteter Kontrollmäuse.

- a) Lunge unbehaltete Maus Nr.3. Pfeil deutet auf ein Blutgefäß.
- b) Niere unbehaltete Maus Nr.1. Pfeilspitzen deuten auf Glomeruli.
- c) Lunge Antiserum-behandelte Maus Nr.3. Pfeil deutet auf ein Blutgefäß. Entzündliche Infiltrate sind nicht zu erkennen.
- d) Niere Antiserum-behandelte Maus Nr.4. Pfeilspitze deutet auf Glomerulus. Segmentale Nekroseherde sind nicht zu erkennen. Innerhalb des Glomerulus sind mehr Zellkerne angefärbt als bei dem Kontrollpräparat.

Färbung: Hämatoxylin-Eosin, Schichtdicke: 10µm, Originalvergrößerungen 400-fach.

4.7 Murine c-ANCA (mc-ANCA) verstärken eine lokale Entzündungsreaktion in der Haut

Wie in Kap. 1.4 und 5.7 näher erläutert, spielt die Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren, ausgelöst z. B. durch Primärinfektionen, bei der Wegener'schen Granulomatose vermutlich eine wichtige Rolle. Ein primärer Stimulus wurde bei dem in diesem Kapitel beschriebenen Versuch in Form von TNF α lokal appliziert. Wegen der einfachen Zugänglichkeit und der häufigen Beteiligung bei WG wurde die Haut als Zielorgan gewählt. Eine Reihe von Studien belegt die Rolle von TNF α bei der Ausbildung lokaler Entzündungsreaktionen in der Haut, deren Verlauf einer Schwartzmann-Reaktion ähnelt [215, 280, 178]. Um den chronischen Verlauf einer inflammatorischen Reaktion in Anwesenheit von c-ANCA experimentell nachzuahmen, wurde durch die wiederholte, lokale Injektion von TNF α eine leichte Entzündungsreaktion in der Haut über mehrere Tage ausgelöst.

Zunächst wurde Wildtyp-Mäusen 25 μ l pro-rmPR3- oder 50 μ l rmPR3-Antiserum bzw. 50 μ l Kontrollserum (Kap. 3.21.1) intravenös verabreicht und anschließend intradermal an einer zuvor freirasierten Stelle der dorsolateralen Rückenhaut 50ng murines TNF α injiziert. Auf der anderen Körperseite wurde als Negativkontrolle PBS/0,1% BSA oder PBS appliziert. Die TNF α -Injektionen wurden über einen Zeitraum von 4 Tagen täglich an der gleichen Stelle wiederholt. 24 Stunden nach der letzten Injektion wurden Biopsien der behandelten Hautpartien entnommen, fixiert und für histopathologische Untersuchungen präpariert.

Die Behandlung mit TNF α rief eine schwache, lokale subkutane Pannikulitis bei allen Kontrollserum-behandelten Mäusen hervor. Diese wurde wie folgt quantifiziert:

Alle Bereiche einer seriell geschnittenen Biopsie mit verdickten Septen (normalerweise stellen sich die Adipozyten der subkutanen Fettschicht in histologischen Schnitten als dünne Gewebesepten dar, im Falle einer Entzündung vergrößert sich das scheinbare Volumen der Septen) wurden unter einfachen Blindbedingungen bestimmt. An einem digitalisierten Bild der histologischen Präparate wurde ein Fenster angelegt, das dem Umfang des betroffenen Gewebes entsprach. Mit Hilfe des angelegten Fensters wurde die Fläche des inflammatorischen Fokus in Abständen von 40-60 μ m vertikal zur Schnittebene unter Verwendung des Bildanalyseprogramms KS 300 v3.0 (Zeiss) bestimmt (Abb. 4.24). Ein zuvor festgelegter Schwellenwert für Farbintensität erlaubte die digitalisierte Identifikation und Darstellung des Gewebes, das sich aufgrund seiner Färbung vom Hintergrund abhebt. In die Adipozyten eingelagertes Fett wurde bei dieser Methode nicht als Fläche miteinbezogen.

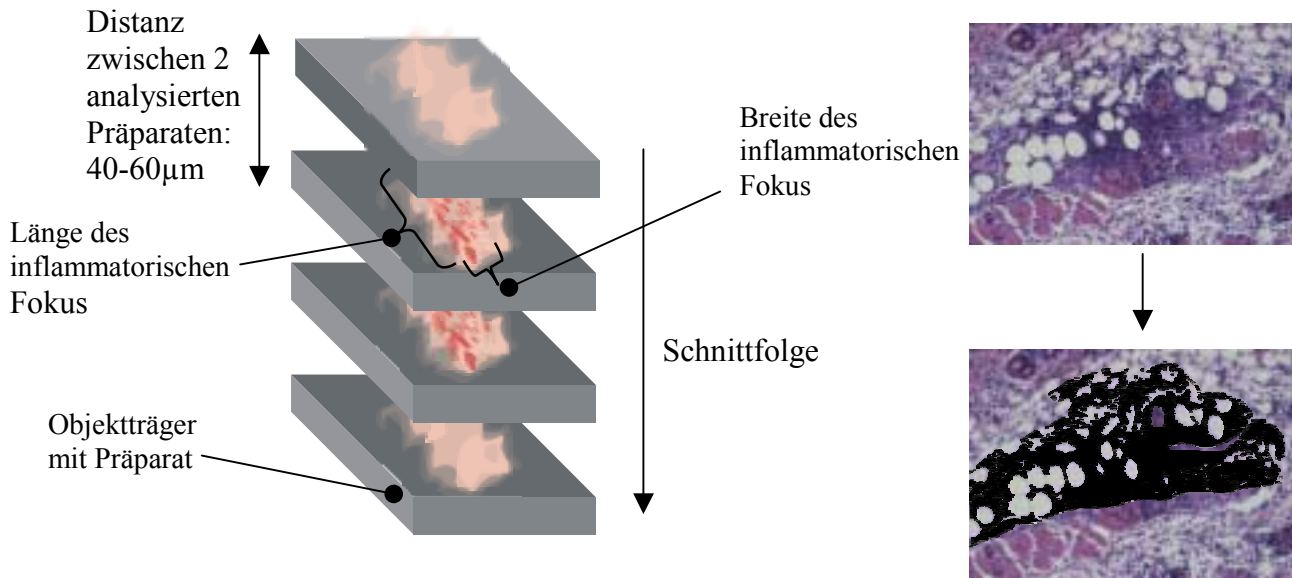


Abb. 4.24: Schematische Darstellung der Quantifizierung eines inflammatorischen Fokus.

Die gesamte Hautbiopsie eines Versuchstieres wurde seriell (Schichtdicke $5\mu\text{m}$) geschnitten. Das auf einem Objektträger (grau dargestellt) aufgebrachte, gefärbte Präparat (rosa) wurde mit einem Bildanalyseverfahren ausgewertet. Hierbei wurde die Fläche des inflammatorischen Fokus (rot) pro Objektträger bestimmt. Rechts ist beispielhaft die quantitative Bestimmung der Fokusfläche eines Präparates gezeigt. Zunächst wurde ein Fenster angelegt, das dem Umfang des inflammatorischen Fokus' entsprach (Blutgefäße wurden ausgespart). Innerhalb dieses Fensters wurde eine vom Bildanalyseprogramm erstellte Maske (hier schwarz dargestellt) aufgelegt, die der Fläche des betroffenen Gewebes entsprach. Die Fläche der aufgelegten Maske wurde berechnet und die 6-9 konsekutiven Objektträger (entsprechend $300\mu\text{m}$ vertikal zur Schnittebene) mit den Maximalwerten ausgewählt. Diese gingen in die Berechnung der durchschnittlichen Fokusfläche ein (s. Tab. 4.2).

Der quantitative Vergleich $\text{TNF}\alpha$ -behandelter Hautbiopsien mit PBS- und BSA-behandelten Kontrollbiopsien zeigte, daß diese Methode einen verlässlichen Parameter für die Quantifizierung des lokalen inflammatorischen Fokus liefert. Signifikante Unterschiede zwischen BSA- und PBS-behandelten Hautbiopsien waren nicht feststellbar (Tab. 4.2). Wie die vergleichende Auswertung der Hautbiopsien von Antiserum- und Kontrollserum-behandelten Mäusen ergab, ist die Nettogröße (d. h. $\text{TNF}\alpha$ -behandelte Seite minus Kontrollseite) des inflammatorischen Fokus der mc-ANCA-behandelten Mäuse signifikant größer als der von Kontrollmäusen (Abb. 4.25). Bei 8 von 9 rmPR3-Antiserum-behandelten Tieren wurden höhere Werte ermittelt, als bei den zum jeweiligen Experiment zugehörigen Kontrolltieren. Bei pro-rmPR3-behandelten Tieren war der Unterschied weniger deutlich ausgeprägt. Allerdings liefern hier die Kontrolltiere einen weniger geeigneten Vergleichswert, da in diesem Fall die intravenös injizierten Serummengen bei beiden Gruppen nicht identisch waren ($25\mu\text{l}$ pro-rmPR3-Antiserum, $50\mu\text{l}$ Kontrollserum).

| Intravenöse Injektion | Maus Nr. (Symbol in Abb. 4. 25 c) | TNF α -behandelte Seite | Kontrollseite (0,1% BSA) | Kontrollseite (PBS) |
|-----------------------|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------|---------------------|
| pro-rmPR3-Antiserum | 1 (□) | 130,5 | 44,7 | - |
| | 2 (●) | 119,1 | 29,9 | - |
| | 3 (▲) | 142,6 | - | 11,7 |
| | 4 (▲) | 108,8 | - | 58,2 |
| | Durchschnitt | 125,3 | 37,3 | 35 |
| rmPR3-Antiserum | 5 (□) | 91,6 | 48,7 | - |
| | 6 (□) | 164,7 | 17 | - |
| | 7 (◆) | 138,1 | 85,5 | - |
| | 8 (◆) | 157,5 | 7,5 | - |
| | 9 (◆) | 191,9 | 16 | - |
| | 10 (▲) | 116,1 | - | 41,3 |
| | 11 (▲) | 130,3 | - | 8,1 |
| | 12 (●) | 207,1 | - | 49 |
| | 13 (●) | 151 | - | 11 |
| Durchschnitt | 149,8 | 34,9 | 27,4 | |
| Kontrollserum | 14 (□) | 65,7 | 3 | - |
| | 15 (◆) | 36,7 | 24,3 | - |
| | 16 (◆) | 57,8 | 51,7 | - |
| | 17 (●) | 161,8 | 77,8 | - |
| | 18 (▲) | 140,1 | - | 69,9 |
| | 19 (▲) | 92,2 | - | 24,2 |
| | 20 (●) | 130,3 | - | 44,4 |
| | 21 (●) | 162,2 | - | 72,6 |
| Durchschnitt | 105,9 | 39,2 | 52,8 | |

Tab. 4.2: Die lokale Injektion von TNF α in die Haut ruft eine subkutane Pannikulitis hervor.

Dargestellt sind die nach der in Abb. 4.24 beschriebenen Methode mit dem digitalen Bildanalyseverfahren KS300 (Zeiss) ermittelten Werte. Signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollseiten Antiserum- bzw. Kontrollserum-behandelter Tiere sind nicht feststellbar. Bei den Kontrollserum-behandelten Tieren sind hohe Werte auf der Kontrollseite meist mit hohen Werten auf der TNF α -behandelten Seite korreliert.

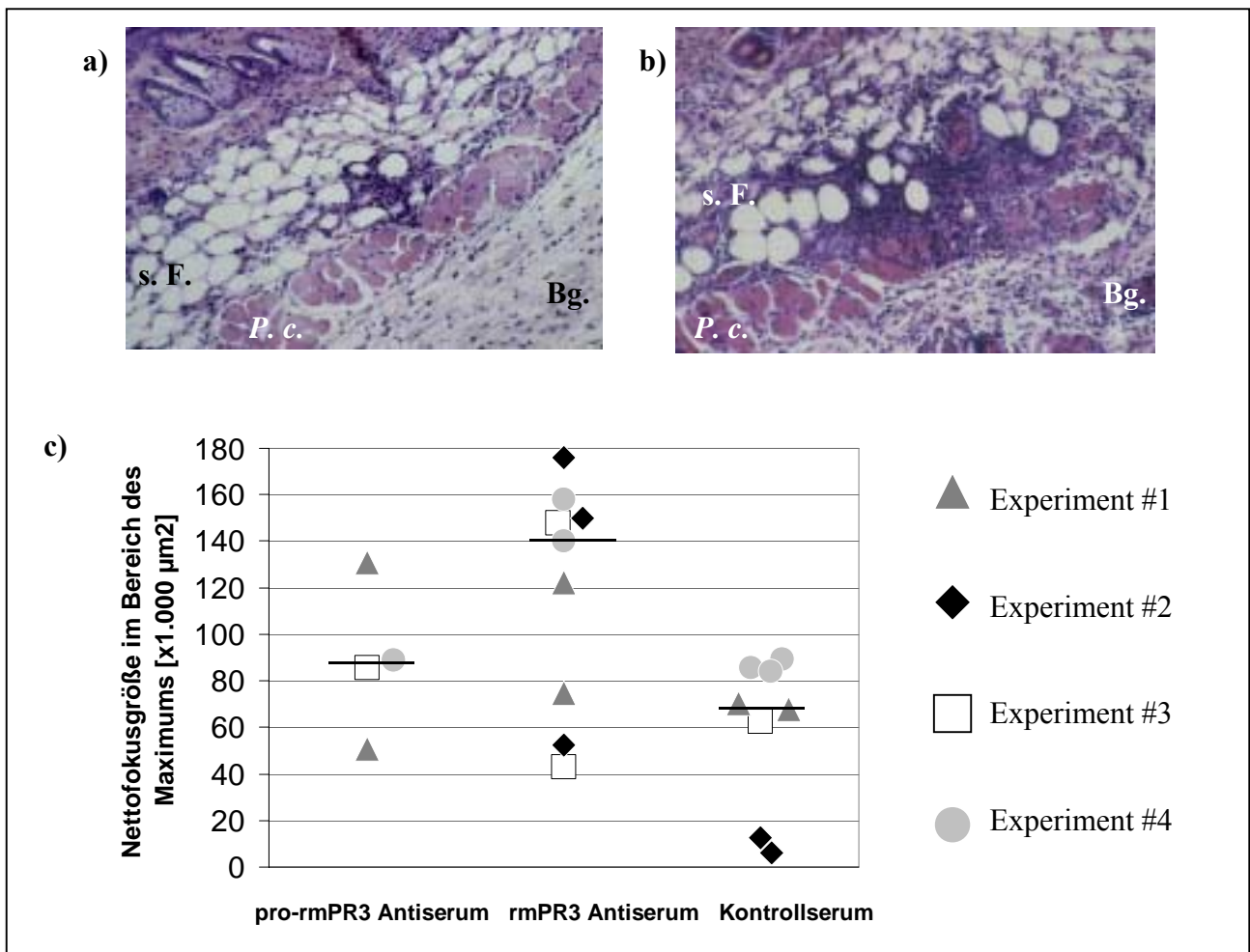


Abb. 4.25: Eine lokale TNF α -induzierte, subkutane Pannikulitis wird durch systemische mc-ANCA verstärkt.

Den Versuchstieren wurde Antiserum bzw. Kontrollserum intravenös verabreicht und anschließend TNF α lokal auf einer Körperseite dorsolateral in die Haut injiziert. An einer gegenüber liegenden Stelle wurde als Kontrolle PBS oder PBS/0,1% BSA (s. Tab. 4.2) injiziert. Die Fläche des durch TNF α hervorgerufenen inflammatorischen Fokus im subkutanen Fettgewebe (s. F.) wurde mit einem digitalen Bildanalyseprogramm vermessen (s. Abb. 4.24).

Die in (c) gezeigten Datenpunkte stellen die durchschnittliche Nettofokusgröße einzelner Tiere aus vier unabhängigen Experimenten dar (die unterschiedlichen Symbole zeigen die Zugehörigkeit der einzelnen Meßwerte zu einem Experiment an). Die Nettofokusgrößen wurden durch Subtraktion der Fokusfläche der Kontrollseite von der Fokusfläche der TNF α -behandelten Seite erhalten. Horizontale Linien zeigen den Medianwert an. Der Unterschied zwischen pro-rmPR3/rmPR3-Antiserum-behandelten Tieren und Kontrollserum-behandelten Tieren ist statistisch signifikant (Mann-Whitney U-Test: p=0,043).

Oben sind repräsentative Biopsien (Originalvergrößerung 200-fach) einer Kontrollserum-behandelten (a) und einer rmPR3-Antiserum-behandelten (b) Maus abgebildet. Das dichte zelluläre Infiltrat im subkutanen Fettgewebe, bestehend aus polymorphkernigen Zellen als auch aus Lymphozyten, ist von einer offensichtlichen, lokalen Zunahme des Septenvolumens begleitet. In einigen Biopsien wurden dichte Infiltrate innerhalb des *Panniculus carnosus* (*P. c.*) und im darunterliegenden Bindegewebe (Bg.) sowohl interstitiell als auch perivaskulär beobachtet. Allerdings war der Unterschied zwischen Antiserum- und Kontrollserum-behandelten Tieren in dieser Hinsicht weniger deutlich.

Die Anwesenheit systemischer mc-ANCA kann folglich TNF α -induzierte lokale Entzündungsreaktionen verstärken. Mit dieser Versuchsanordnung ließ sich aber nicht beweisen, ob mc-ANCA die Entstehung von Vaskulitis fördern, denn auch bei Kontrollserum-behandelten Tieren wurden (TNF α -bedingte) Gefäßentzündungen beobachtet. Auch Granulome wurden in keinem der untersuchten Hautpräparate gefunden. Daher wurde durch Verlängerung der Behandlung und Erhöhung der TNF α -Dosis (9 mal täglich 100ng TNF α) in 2 weiteren Experimenten mit insgesamt 5 rmPR3-Antiserum-, 2 pro- rmPR3-Antiserum- und 3 Kontrollserum-behandelten Mäusen versucht, eine WG-ähnliche Pathologie in der Haut zu erzeugen. 2 von 3 rmPR3-Antiserum-behandelten Mäusen entwickelten in diesem Versuch entzündliche Veränderungen an der TNF α -behandelten Stelle (Abb. 4.26), die mit granulomatösen Läsionen der WG Ähnlichkeiten aufweisen. Dagegen wurde weder bei Kontrollserum- behandelten Mäusen noch auf der Kontrollseite (PBS/0,1%BSA behandelt) aller Tiere ähnliche Veränderungen beobachtet. Bei den 2 pro-rmPR3-Antiserum-behandelten Mäusen wurden ebenfalls keine vergleichbaren Befunde erhalten.

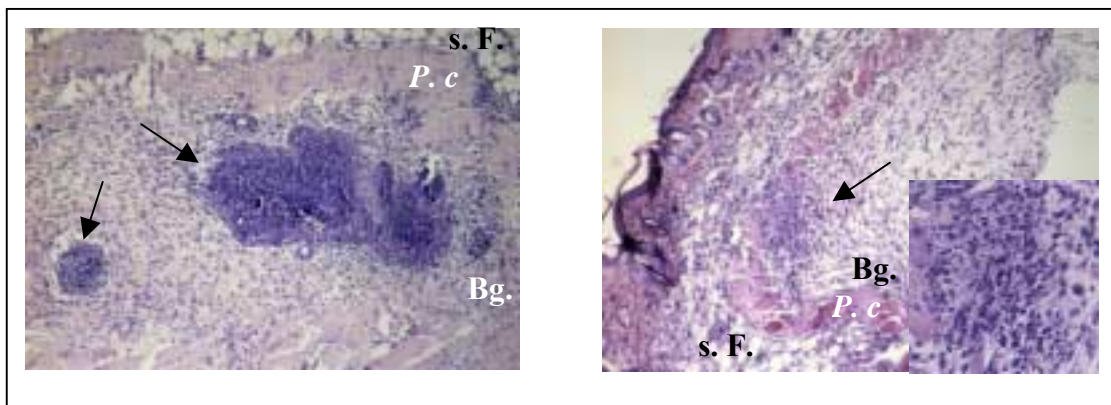


Abb. 4.26: In Anwesenheit systemischer mc-ANCA können mit Hilfe von TNF α Läsionen induziert werden, die WG-Granulomen ähneln.

Die Versuchstiere wurden wie in Abb. 4.25 behandelt, jedoch wurde die Behandlungsdauer auf 9 Tage verlängert und die TNF α -Dosis verdoppelt. Zwei von fünf Antiserum-behandelten Tieren entwickelten nach 10 Tagen Läsionen am Injektionsort von TNF α . Die Zellinfiltrate setzten sich sowohl aus mononukleären Zellen als auch aus polymorphkernigen Zellen zusammen.

- a) Im Bindegewebe sind zwei dichte Zellinfiltrate zu sehen (Pfeile). Sie sind von reaktivem, evtl. nekrotischem Gewebe umgeben. Im Zentrum sind zum Teil verdichtete Bereiche mit Kernstaub lokalisiert. Das Infiltrat enthält viele Eosinophile. Diese Läsion ähnelt einem Mikroabszess (vgl. Abb. 1.2). Vergrößerung 200-fach.
- b) Die zweite Maus wies eine granulomatöse Veränderung am Rande des *Panniculus carnosus* auf. Teilweise sind die Zellen pallisadenförmig angeordnet (kleines eingeschobenes Bild, Vergrößerung 400-fach), ein typisches Merkmal von Granulomen bei WG-Patienten. Vergrößerung 100-fach.

5 Diskussion

Die Neutrophilen-Serinprotease PR3 ist mutmaßlich in zweierlei Hinsicht in die Pathogenese der Wegener'schen Granulomatose involviert: zum einen ist sie das Zielantigen von Anti-Neutrophilen Zytoplasma-Autoantikörpern (c-ANCA), zum anderen ist sie aufgrund ihres lysogenen Potentials an der Gewebe- und Organschädigung während des Krankheitsverlaufs aktiv beteiligt. Zahlreiche Studien belegen außerdem, daß PR3 und andere Granula-assoziierte Serinproteasen modulierend auf Inflammationsprozesse einwirken können [192, 229, 259, 66, 255, 12, 13, 58] und Gewebe und Organe synergistisch schädigen [168, 8, 347].

Ob c-ANCA bei der Pathogenese der Wegener'schen Granulomatose eine kausale Rolle spielen oder ob sie lediglich epiphänomenal auftreten, konnte bis heute nicht geklärt werden.

Um beide Aspekte zu berücksichtigen, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei methodische Ansätze gewählt:

- (1) Funktionelle Charakterisierung der murinen PR3 mit Hilfe rekombinanter PR3 *in vitro* und Untersuchung der Auswirkungen einer PR3/NE-Defizienz *in vivo*;
- (2) Analyse des pathogenen Potentials von PR3-Antikörpern *in vivo*

5.1 Phänotypische Charakterisierung PR3/NE-defizienter Mäuse

Wie bereits erwähnt, sind die Neutrophilen-Serinproteasen Proteinase 3 und Elastase für die Funktion neutrophiler Granulozyten essentiell und sind an der Modulation von Immunreaktionen beteiligt (Kap. 1.5). Studien mit humanen Leukämiezelllinien zufolge ist PR3 auch an der Proliferationsregulation granulopoietischer Vorläuferzellen beteiligt [31, 291, 283]. Beim Menschen ist die erbliche zyklische Neutropenie überdies mit einem monoallelischen Defekt des Neutrophilen-Elastase-Gens assoziiert [149].

Bei PR3/NE-defizienten Mäusen ließ sich aber weder eine erhöhte Variation der Anzahl neutrophiler Granulozyten in peripherem Blut nachweisen noch wichen die Durchschnittswerte von denen in Wiltyp-Mäusen ab. Bei 2 Mäusen pro Genotyp wurde darüber hinaus ein Gesamtprofil des Blutes erstellt (analysierte Parameter: GPT, GGT, AP, CHE, LDH, CK, K, NA, CA, PHOS, Ca/Phos.-Q, MG, BZ, HST, KREA, CHOL, TRI, BILI, DBIL, IBIL, FE, EIW, GOT, ERY, HB, HK, MCV, MCH, MCHC, THRO; Daten nicht gezeigt). Es wurden keine signifikanten Unterschiede der erfaßten Parameter festgestellt. Eine Blutgerinnungsstörung wurde bei den zwei untersuchten PR3/NE-

defizienten Tieren ebenfalls nicht festgestellt (Thromboplastinzeit (PTT): WT: 27,9s und 20,4s; PR3/NE-defizient: 25,1s und 25,6s).

Wie von Belaouaj und Mitarbeitern gezeigt werden konnte, führt homozygote Elastase-Defizienz bei Mäusen zu einer erhöhten Infektanfälligkeit gegenüber gram-negativen Bakterien [20]. Hingegen zeigen Cathepsin-G-knock-out-Mäuse keine Störungen der Neutrophilen-Funktion [198]. Allerdings konnte eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber *Aspergillus fumigatus* nachgewiesen werden, welche in NE/CatG-defizienten Mäusen noch gesteigert ist [314]. Dieser Befund läßt vermuten, daß sich offensichtlich aufgrund funktioneller Redundanz ein Phänotyp bei Defizienz einer einzelnen Protease häufig schwer nachweisen läßt. Die Verwendung doppelt defizienter Mäuse sollte folglich die Wahrscheinlichkeit, einen Phänotyp zu detektieren, erhöhen.

Die von Belaouaj und Kollegen beobachtete gesteigerte Infektanfälligkeit NE-defizienter Mäuse gegenüber gram-negativen Erregern beruht auf einer gestörten Elimination in den Phagosomen neutrophiler Granulozyten. Wie später gezeigt werden konnte, spaltet NE das Membranprotein OmpA (*outer membrane protein A*) gram-negativer Bakterien und stellt damit einen wichtigen Mechanismus nicht-oxidativer Vernichtung von Erregern [20, 19] dar. Eine weitergehende Charakterisierung von Mäusen mit einer Defizienz für eine der drei Serinproteasen Cathepsin G, Elastase und PR3 ist in der Literatur aber nicht dokumentiert.

Aufgrund des breiten immunmodulatorischen Spektrums der beiden Serinproteasen erschien deshalb die Analyse der PR3/NE-defizienten Mäuse anhand zweier Modellexperimente sinnvoll.

- (1) Durch die quantitative Bestimmung der Phagozytoseleistung wurde eine Beteiligung von NE und PR3 bei Chemotaxis und Phagozytose *in vitro* untersucht;
- (2) Die reverse, passive Arthus-Reaktion wurde als Modell für eine akute, entzündliche, Immunkomplexreaktion *in vivo* herangezogen.

Die Phagozytoseleistung PR3/NE-defizienter neutrophiler Granulozyten ist in Anwesenheit hoher Konzentrationen Heparin stärker beeinträchtigt als bei Wildtyp-Zellen

Es wurde von verschiedenen Forschungsgruppen gezeigt, daß Heparin eine inhibitorische Wirkung auf die Phagozytoseaktivität neutrophiler Granulozyten ausübt [324, 186, 267]. Warum bei Konzentrationen von >2000 U/ml ($\cong 700\mu\text{M}$) die Phagozytosekapazität NE/PR3-defizienter neutrophiler Granulozyten stärker beeinträchtigt wird, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit experimentell nicht geklärt werden. Da die Phagozytoseexperimente in Vollblut durchgeführt wurden, ist eine Interpretation besonders schwierig.

Weil sich die Fluoreszenzintensität, d. h. die Anzahl aufgenommener Bakterien pro phagozytierendem Granulozyt, zwischen den beiden Genotypen nicht unterscheidet, scheint der Phagozytoseprozess selbst nicht gestört zu sein. Die Ursache der beobachteten Unterschiede ist vielmehr während des Vorgangs der Aktivierung bzw. Chemotaxis und/oder Anlagerung von Bakterien an die Neutrophilenmembran zu suchen.

Verstärkt die Anwesenheit von Heparin einen subtilen Phänotyp der PR3/NE-defizienten Mäuse?

Heparin könnte einen Einfluß auf ko-chemotaktische Faktoren im Plasma ausüben. Es wurde zum Beispiel gezeigt, daß das Vitamin D-bindende Protein (DBP, Gc-Globulin), das die chemotaktische Aktivität von C5a auf Neutrophile verstärkt, über ein Chondroitinsulfatproteoglykan an die Plasmamembran neutrophiler Granulozyten bindet [80]. Diese Bindung könnte durch Heparin teilweise kompetitiv gehemmt werden. Die Bindung von DBP wird zudem von NE reguliert [81].

Oder es könnten Chemokine, die aufgrund ihres kationischen Charakters an Heparin binden können, an diesem Phänomen beteiligt sein (Zusammenfassung in [109, 174, 137]). Es konnte von Webb und Mitarbeitern gezeigt werden, daß der durch Interleukin 8 (IL-8) induzierte Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels neutrophiler Granulozyten in Anwesenheit von Heparin 4-fach verstärkt wird [330]. Diese Beobachtung könnte insbesondere deshalb von Bedeutung sein, da IL-8 von Cathepsin G und PR3 in eine biologisch aktivere Form prozessiert werden kann [229]. Fehlt PR3 als konvertierendes Enzym, ließe sich dieser Effekt experimentell vielleicht zunächst nicht nachweisen. Heparin könnte dagegen die biologische Wirkung von IL-8 amplifizieren, so daß die höhere Aktivität des konvertierten IL-8 bei Wildtyp-Zellen deutlicher hervortritt.

Heparin hemmt die Inhibition von Cathepsin G durch α 1-AT und α 1-Antichymotrypsin um den Faktor 80000 [92]. Außerdem kann die Aktivität der drei Serinproteasen PR3, NE und Cathepsin G direkt oder durch eine veränderte Wechselwirkung mit physiologischen Inhibitoren durch Heparin moduliert werden [251, 97, 330]. In welcher Weise die biologische Aktivität im Phagozytoseexperiment dadurch beeinflußt wird, läßt sich aufgrund der Komplexität des Phagozytoseprozesses und des breiten Wirkungsspektrums von Heparin kaum abschätzen. Die modulatorische Wirkung von Heparin auf die Serinproteaseaktivität könnte aber analog zu oben den Phänotyp PR3/NE-defizienter Granulozyten hervortreten lassen, der aufgrund funktioneller Redundanz bei niedriger Heparinkonzentration nicht nachweisbar ist. Zahlreiche Publikationen belegen, daß PR3, NE und Cathepsin G in Chemotaxis- und Aktivierungsprozessen neutrophiler Granulozyten involviert sind [292, 9, 185, 184, 45, 195] und die Komplementkaskade aktivieren können [323, 227, 173] (weitere Diskussionspunkte zur Komplementkaskade im folgenden Abschnitt).

Die vorgestellten Beispiele stellen sicher nicht erschöpfend alle Möglichkeiten dar, da das biologische Wirkungsspektrum von Heparin und den drei Serinproteasen äußerst weitgefächert ist (s. auch Kap. 1.5 und 5.2). Die hohe Heparinkonzentration im vorgestellten Experiment wirft auch die Frage nach der biologischen Relevanz der Ergebnisse auf. Betrachtet man die im folgenden besprochenen Ergebnisse der reversen, passiven Arthus-Reaktion, könnten die Befunde des Phagozytoseexperiments aber an Bedeutung gewinnen: auf dem Endothel sind hohe Konzentrationen Heparansulfat und andere Glukosaminglykane lokalisiert, die lokal einen ähnlichen Effekt *in vivo* ausüben könnten wie Heparin in diesem Experiment. Sie modulieren die Funktion einer Vielzahl von Proteinen und können die Zellmigration beeinflussen (Zusammenfassung in [222, 264]).

Bei PR3/NE-defizienten Mäusen ist eine Immunkomplex-induzierte inflammatorische Typ III-Reaktion schwächer ausgeprägt als bei kongenen Wildtyp-Tieren.

Welcher Vorgang löst eine inflammatorische Antwort in einer Typ III-Hypersensitivitätsreaktion aus? Lange Zeit wurde die Immunkomplex-vermittelte Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg als wichtigster Auslöser der Arthus-Reaktion angesehen:

Die Spaltprodukte C3a und C5a des Komplementsystems vermitteln ihre Effektorfunktion über rezeptorvermittelte Aktivierung - Rezeptoren für beide Komponenten wurden auf allen Granulozyten und Makrophagen (C5aR) und Mastzellen (C3aR) nachgewiesen. Deren Aktivierung führt zur Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren, die erhöhte vaskuläre Permeabilität, verstärkte Expression von Zelladhäsionsmolekülen und chemotaktische Rekrutierung inflammatorischer Zellen induzieren (Zusammenfassung in [88]).

Neuere Ergebnisse legen jedoch eine kodominante Rolle von Fc γ R und C5aR in der Arthus-Reaktion nahe [18]: bei der Immunkomplexperitonitis dominiert neben C5aR- die Fc γ RI-vermittelte Aktivierung von Makrophagen, in der dermalen RPA die Fc γ RIII-vermittelte Aktivierung von Mastzellen [304, 305, 142]. Allerdings scheint es signifikante Unterschiede sowohl zwischen verschiedenen Spezies als auch zwischen verschiedenen Stämmen gleicher Spezies zu geben [18, 306]. Aufgrund der beschriebenen Unterschiede wird im folgenden die peritoneale RPA getrennt diskutiert.

5.2 Reverse, passive Arthus-Reaktion in der Haut

Bei Entzündungsreaktionen während einer RPA in der Haut werden zwei Klassen von Mediatoren postuliert, die vaskuläre Permeabilität erhöhen:

1. Mediatoren wie Bradykinin oder Histamin wirken direkt auf das Endothel.
2. Mediatoren wie C5a, Leukotrien B₄ (LTB₄), fMLP [331], PAF (*platelet activating factor*) [332] und IL-8 [60, 233] üben einen indirekten Einfluß aus, der von neutrophilen Granulozyten vermittelt wird.

Die Beobachtung, daß bei PR3/NE-defizienten Mäusen 8 Stunden nach einer RPA PMN primär entlang der Gefäßwände lokalisiert sind [105], interstitiell aber nur in geringer Zahl auftreten, könnte durch die Modulation der Zellmigration und Adhäsion durch NE erklärt werden: die Oberflächenexpression von hNE ist invers proportional korreliert zur Adhäsivität von PMN, außerdem fungiert NE als endogener Ligand von CD11b/CD18 [46]. Es wird vermutet, daß diese Eigenschaft zur Loslösung Integrin-vermittelter Zelladhäsion beiträgt und so die Migration aus dem Gefäß ins Interstitium ermöglicht. HNE kann zudem das Membranprotein CD43 auf Endothelzellen, das anti-adhäsive Eigenschaften besitzt, spalten und so die Adhäsion von Neutrophilen verstärken [253]. Einerseits könnte also PR3-Defizienz zu geringerer Adhäsion von zirkulierenden Neutrophilen führen, (keine Spaltung von CD43) andererseits würden adhärenente Neutrophile nicht transendothelial migrieren (keine kompetitive CD11b/CD18-Bindung). Neuere Studien legen nahe, daß NE auch direkt durch lokale Proteolyse extrazellulärer Matrix zur transendothelialen Migration beiträgt [53]. Schließlich könnte auch das Fehlen von Serinprotease- α 1-AT-Komplexen die verminderte Reaktion teilweise erklären, denn Serinprotease-Serpin-Komplexe (SEC), die bei einer lokalen Entzündungsreaktion entstehen, üben einen chemotaktischen Reiz auf neutrophile Granulozyten aus [163]. Fehlende Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen durch PR3/NE ist als Ursache ebenfalls denkbar [326].

In der vorliegenden Arbeit wurde bereits in der Initialphase der Arthus-Reaktion, quantifiziert anhand der Ödembildung innerhalb der ersten 60 Minuten, eine deutlich schwächere Antwort bei PR3/NE-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren beobachtet. Da die Intensität der Hämorrhagie auch von der Intensität des Ödems bestimmt wird [304] und indirekte Mediatoren Auswirkungen bis in die Hämorrhagiebildungsphase hinein haben können (z. B. C5a: $t_{1/2}$ =95 Minuten im Kaninchen, [331]), soll nun die Initialphase der Arthus-Reaktion diskutiert werden.

Wie eingangs bereits erwähnt, spielen neutrophile Granulozyten in der Ödembildungsphase bei der RPA eine entscheidende Rolle. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen diese Vermutung. Doch welche Rolle spielen die Serinproteasen PR3 und/oder NE bei diesem Prozeß? Die Ergebnisse der Phagozytoseexperimente legen nahe, daß PR3/NE unter den beschriebenen Bedingungen direkten Einfluß (ohne Wechselwirkung mit Endothelzellen!) auf die Chemotaxis/Aktivierung von Neutrophilen ausüben. Grundsätzlich könnten die diskutierten Faktoren auch bei der RPA involviert

sein. Zusätzlich muß *in vivo* aber auch der Einfluß auf das Endothel und die Interaktion des Endothels mit neutrophilen Granulozyten berücksichtigt werden [317]. Die einfachste Erklärung könnte die Eigenschaft von NE liefern, vaskuläre Permeabilität zellunabhängig zu erhöhen [235].

Die Depletion von zirkulierenden Neutrophilen inhibiert sehr effektiv die RPA-induzierte Extravasation von Albumin und Ödembildung in der Haut von Kaninchen [296, 150]. In ähnlicher Weise läßt sich Ödembildung und Hämorrhagie durch Anti-CD11/CD18-Antikörper oder durch einen ICAM-1-Antikörper unterdrücken [217, 287]. Die Interaktion von Neutrophilen mit dem Endothel könnte bei PR3/NE-defizienten Mäusen gestört sein, denn NE kann sowohl selbst als Ligand von CD11b/CD18 fungieren [46], als auch dessen endothelialen Liganden ICAM-1 proteolytisch spalten [54]. Zusätzlich könnte auch die Aktivierung durch C3bi, dessen Rezeptor CD11b/CD18 ist, gestört sein.

Eine wichtige Rolle spielt bei der RPA das Komplementsystem, das vermutlich auch durch lysosomale Enzyme wie PR3 oder NE aktiviert werden kann (Zusammenfassung in [88]). Die Anaphylatoxine C3a, C4a und C5a erhöhen indirekt die vaskuläre Permeabilität, die vermutlich durch Histamin aus Anaphylatoxin-aktivierten Mastzellen und Basophilen hervorgerufen wird [161, 121]. Andererseits aktiviert C5a neutrophile Granulozyten und stimuliert die Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen (der Einfluß von Vasodilatoren an der Ödembildung in einer RPA wurde ebenfalls nachgewiesen) [309]. Zudem stimuliert es Neutrophile und Endothelzellen zur verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen [103]. An C5aR-defizienten Mäusen wurde dessen zentrale Rolle bei der RPA nachgewiesen [146].

5.3 Immunkomplexperitonitis

Die Peritonealhöhle eignet sich besonders zur Bestimmung von lokalen Zytokinspiegeln bei der RPA. Auf diese Weise läßt sich der Einfluß von PR3/NE insbesondere auf TNF α -Spiegel zeigen.

Die Beteiligung von Komplement, TNF α und Fc γ R-vermittelter Aktivierung von Mastzellen und Makrophagen bei der Initiation der RPA wird in der Literatur widersprüchlich dokumentiert. Neuere Ergebnisse jedoch lösen diese offensichtlich unvereinbaren Befunde: entgegen der lange Zeit gängigen Annahme, daß der RPA ein einheitlicher Mechanismus zugrunde liegt, belegen die Arbeiten von Heller und Mitarbeitern, Baumann und Mitarbeitern und Szalai und Mitarbeitern eine Stamm-abhängige und gewebeabhängige Beteiligung von Komplement, Mastzellen und Makrophagen [142, 18, 306]. Diese Arbeiten sind deshalb für die Evaluierung der in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse von besonderer Bedeutung.

Die Interpretation ist dennoch nur in sehr begrenztem Umfang möglich, denn

- (1) für den Inzuchtstamm 129/SV/EV sind keine Daten in der Literatur über die Reaktionskinetik und beteiligte Faktoren bei der Immunkomplexperitonitis belegt,
- (2) die erhaltenen Ergebnisse sind äußerst heterogen und bedürfen zur Erzielung statistisch signifikanter Aussagen weiterer experimenteller Bestätigung,
- (3) die Negativkontrollen lösten bereits eine signifikante Reaktion aus.

Die gewählten Meßzeitpunkte (4 Stunden und 6 Stunden nach Injektion) sind den Befunden von Zhang und Mitarbeitern entlehnt, die bei WWB6-Mäusen einen maximalen TNF α -Spiegel 6 Stunden nach Injektion beschreiben [351]. Bei BALB/c und C57BL/6 tritt das Maximum bereits nach ca. 2 Stunden auf, weitere 4 Stunden später läßt sich kein TNF α mehr im Peritonealexsudat nachweisen [142]. Die Reaktionskinetik der in der vorliegenden Arbeit verwendeten 129/SV/EV-Mäuse scheint eher der letzteren zu ähneln, denn 6 Stunden nach Injektion war auch hier kein TNF α mehr nachweisbar. Bei PR3/NE-defizienten Mäusen scheint die RPA hingegen verzögert abzulaufen, denn zumindest bei 2 der 4 getesteten Mäuse wurde ein äußerst starker Anstieg nach 6 Stunden beobachtet. Die Anzahl der Neutrophilen im Exsudat unterschied sich dagegen nicht. Allerdings folgt die Infiltration der Neutrophilen nicht ausschließlich einer Immunkomplex-vermittelten Reaktionskinetik, denn die Kontrollinjektion von Antikörper ohne Antigen resultierte beim WT ebenfalls in einer starken Neutrophileninfiltration. Auffällig ist die (beim 4 Stunden-Wert bei WT sogar etwa proportionale) Korrelation von Neutrophilenzahl und TNF α -Spiegel. Hierbei unterscheiden sich WT und PR3/NE-defiziente Tiere nach 4 Stunden deutlich: Bei vergleichbarer Neutrophilenzahl ist der TNF α -Spiegel bei Wildtyp-Tieren deutlich höher als bei PR3/NE-defizienten Mäusen. Dieser Befund entspricht den Ergebnissen von WBB6-Mäusen, bei BALB/c und C57BL/6 hingegen liegt keine Kopplung der beiden Parameter vor [244, 142]. Dieses Ergebnis könnte darauf hinweisen, daß PR3/NE an der Freisetzung von TNF α beteiligt sind. Da nach 6 Stunden bei PR3/NE-defizienten Mäusen ein deutlicher Anstieg beobachtet wurde, erfolgt im Verlauf der Reaktion aber offensichtlich auch eine PR3/NE-unabhängige Liberation von TNF α . Im Hinblick auf die Ergebnisse aus dem vorangegangenen Kapitel könnte also auch eine allgemein abgeschwächte oder verzögerte inflammatorische Reaktion als Ursache für den niedrigeren TNF α -Spiegel in Frage zu kommen.

Das Vorläufermolekül von TNF α wird auf Monozyten als 26kDa-Transmembranprotein exprimiert [181]. Anschließend wird es durch die Matrix-Metalloprotease TACE (*TNF α converting enzyme*) abgespalten [27, 214]. TNF α kann in lokalen, inflammatorischen Foki mit hoher Neutrophilendichte alternativ von PR3 gespalten werden [259, 58]. Möglicherweise rührt der niedrigere TNF α -Spiegel bei PR3/NE-defizienten Mäusen im Peritonealexsudat 4 Stunden nach Induktion der RPA vom Fehlen der durch PR3 gespaltenen TNF α -Moleküle her. Dies ließe sich überprüfen, indem die TNF α -

Serumspiegel parallel getestet würden. Heller und Mitarbeiter konnten zeigen, daß sich im peripheren Blut ein Anstieg des TNF α -Spiegels noch vor dem in der Peritonealhöhle nachweisen läßt [142]. Sie folgerten daraus eine Immunkomplex-vermittelte Aktivierung zirkulierender Monozyten und Neutrophilen. Sollte der Serumspiegel bei PR3/NE-defizienten Mäusen ebenfalls erniedrigt sein, spräche das gegen eine PR3-vermittelte Spaltung von pro-TNF α , denn systemische PR3 sollte aufgrund des hohen α 1-AT-Spiegels im Blut seine proteolytische Aktivität gegen membranständiges TNF α kaum entfalten können. Der Umkehrschluß, d. h. gleicher TNF α -Spiegel bei beiden Genotypen spräche für die Theorie, ist jedoch nicht zwingend.

Trotz signifikant verschiedener TNF α -Spiegel unterschied sich die Zahl peritonealer Neutrophiler zwischen den untersuchten Genotypen nicht. Ob TNF α eine Rolle bei der Rekrutierung von Granulozyten spielt, läßt sich aus den Ergebnissen nicht ableiten, denn PR3 und NE besitzen nicht nur proinflammatorische sondern auch antiinflammatorische Eigenschaften: die Abspaltung von membranständigem TNF α (proinflammatorisch) könnte durch die NE-vermittelte Abspaltung des TNF-Rezeptors auf Neutrophilen (anti-inflammatorisch) kompensiert werden [241].

Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente lassen eine eindeutige Zuordnung der Faktoren, die von PR3/NE beeinflußt werden, nicht zu. Das Modellsystem sollte es jedoch in zukünftigen Arbeiten ermöglichen, die beteiligten Faktoren zu identifizieren. Da PR3/NE unerwartet in einer bereits sehr frühen Phase einer akuten Entzündungsreaktion beteiligt sind, läßt sich der Kandidatenkreis jedoch wie oben beschrieben einengen. Den beiden Serinproteasen könnte allerdings sowohl bei der Initiation (z. B. Komplementaktivierung) aber auch im weiteren Verlauf aufgrund ihrer proinflammatorischen (Erhöhung vaskulärer Permeabilität, Komplementaktivierung, Modulation von Zelladhäsionsmolekülen) und anti-inflammatorischen Wirkung (Modulation von Zelladhäsionsmolekülen, Spaltung von Zytokinrezeptoren) eine zentrale Rolle zukommen. Zwar äußert sich PR3/NE-Defizienz in dem vorgestellten Modell durch eine abgeschwächte oder verzögerte inflammatorische Reaktion, deren Auswirkung dürfte jedoch eher als Dysregulation statt als mangelhafte Initiation oder Amplifikation einer inflammatorischen Reaktion zu interpretieren sein.

5.4 Rekombinante Expression von mPR3

Kommerziell erhältliche humane PR3 wird aus großen Mengen Blut und in sehr aufwendigen und ineffizienten Arbeitsschritten gewonnen. Für die Herstellung von mPR3 wurde diese Methode nicht in Betracht gezogen, da pro Maus nur ca. 1 ml Blut isoliert werden kann. Weiterhin können Kontaminationen mit anderen Antigenen nie ganz ausgeschlossen werden [168, 192].

Zahlreiche Publikationen beschreiben verschiedene Expressionssysteme, mit denen diese Probleme behoben werden sollen. Die Einsatzfähigkeit des rekombinanten Materials wird jedoch dadurch eingeschränkt, daß c-ANCA an Konformationsepitope der PR3 binden [25]. Die bisher beschriebenen Expressionssysteme in *E. coli* liefern aber ein Produkt, das keine oder nur schwache Immunreaktivität mit c-ANCA-Seren aufweist [25, 114]. Witko-Sarsat und Kollegen exprimierten humane PR3 in Insektenzellen, erhielten aber wie im *E. coli*-Expressionssystem kein oder nur geringe Mengen korrekt gefalteten Enzyms [307, 343, 114]. Für Histidin-markiertes rekombinantes Material aus Hefe (*Pichia pastoris*) wurde zwar spezifische enzymatische Aktivität berichtet, das gereinigte Protein wurde jedoch nur von 60% der getesteten Wegener-Seren gebunden, zudem schlug der Nachweis von Immunreaktivität im direkten Festphasenimmunoassay fehl [138]. Einzig Specks und Jenne gelang es, funktionelle, unmarkierte PR3 von Mensch und Maus rekombinant herzustellen [290, 153]. Die rekombinante Produktion in eukaryotischen Expressionssystemen ist aber generell, wie auch in diesem Fall, teuer und ineffizient.

Die Anforderungen an das rekombinante Protein umfassen für die vorliegende Arbeit zum einen korrekte Faltung, Homogenität und Reinheit, zum anderen muß das Herstellungsverfahren für Immunisierungen ausreichende Mengen liefern. Um Immunreaktivität gegen eine Histidin- oder andere Markierung des gewonnenen Antiserums auszuschließen, wurde die Expression unmarkierter mPR3 angestrebt. Diese Eigenschaften werden von rmPR3, die nach dem in dieser Arbeit vorgestellten Verfahren generiert wurde, erfüllt.

Humane c-ANCA binden deglykosylierte PR3 und natürliche PR3 aus Granulozyten gleichermaßen, die Antigenerkennung ist folglich glykosylierungsunabhängig [343]. Das Fehlen von Zuckerresten der rekombinant hergestellten mPR3 wurde daher nicht als nachteilig bewertet. Zwei wesentliche Nachteile des prokaryotischen Expressionssystems mußten allerdings berücksichtigt werden:

- (1) Heterologe, zytoplasmatisch überexprimierte Proteine bilden in *E. coli* meist Proteinaggregate (Einschlußkörperchen). Sie werden vor allem bei Proteinen mit Disulfidbrücken beobachtet [262].
- (2) Der native N-Terminus von PR3 (Isoleucin) kann nicht direkt generiert werden, da das Translationsstartkodon ATG für Methionin kodiert.

Diese Einschränkungen und Probleme wurden auf folgende Weise gelöst:

- (1) Solubilisierung des Einschlußkörpermaterials unter Oxidation der SH-Gruppen zu gemischten Disulfiden und anschließender Renaturierung.
- (2) Expression als Proenzym mit N-terminaler Extension und anschließender Abspaltung des Propeptids durch Cathepsin C.

Die Renaturierung von Einschlußkörpermaterial ist eine etablierte Methode zur Herstellung rekombinanter Proteine in Milligramm-Mengen [262, 24, 263, 194]. Allerdings gibt es kein universell einsetzbares Protokoll, das die optimale Pufferzusammensetzung und Rückfaltungsbedingungen für jedes Protein angibt. Die optimalen Bedingungen mußten daher für mPR3 empirisch ermittelt werden. Während die Pufferzusammensetzung gegenüber bereits beschriebenen Protokollen [262, 338] kaum verändert wurde, war es aufgrund der beobachteten Instabilität von rmPR3 erforderlich, die Rückfaltungsphase zu verkürzen und das renaturierte Protein rasch in Puffer mit niedrigem pH-Wert (pH 5,5) zu überführen.

Wie mit Hilfe der hGzmK-mPR3 Fusionskonstrukte gezeigt wurde, üben einzelne Aminosäuren des N-Terminus bis AS 14 (Numerierung beginnend am reifen N-Terminus Ile) einen großen Einfluß auf die apparente Expressionseffizienz aus. Zunächst konnte in der Expressionskultur, die in Laemmli-Puffer lysiert wurde, kein rekombinantes Produkt gefunden werden. Überraschenderweise waren Expressionskonstrukte mit ausgesprochen konservativen Einzelmutationen effizient: Austausch einer basischen Aminosäure gegen eine andere basische: Konstrukt mPR3pET24c/F5c (Histidin durch Lysin ersetzt) und Substitution einer hydrophoben Aminosäure gegen eine andere hydrophobe: Konstrukt mPR3pET24c/F6a (Alanin durch Valin substituiert). Weiterhin wurde durch den simultanen Austausch von Valin-17 gegen Isoleucin und Tyrosin-29 (Chymotrypsinogennumerierung) gegen Phenylalanin eine weitere Steigerung der apparenten Expressionsausbeuten erzielt (Konstrukt mPR3pET24c/F3b). Insbesondere am N-Terminus auftretende, seltene Kodons verringern häufig die Ausbeuten bei rekombinanter Expression in *E. coli* [289, 350, 167, 334]. Die Verwendung 5'-terminal kodonoptimierter Expressionskonstrukte macht einen Einfluß bakterienspezifischer Kodonpräferenzen bei der Translation aber unwahrscheinlich. Weiterhin konnte anhand der Expressionskonstrukte mPR3pET24c/F2 und mPR3pET24c/C-S gezeigt werden, daß die N-terminale, putativ bakterizide Domäne keinen Einfluß auf die Expressionseffizienz ausübt. Bangalore und Mitarbeiter konnten zeigen, daß das Peptid Ile-Ile-Gly-Gly-Arg, das dem N-Terminus von Cathepsin G entspricht, antibakterielle Eigenschaften besitzt [10]. Wurde das zweite Ile durch Val ersetzt, was einer Annäherung an den N-Terminus von PR3 entspricht, reduzierte sich das bakterizide Potential. Dieser Befund stützt die These, daß Bakterizidie bei der zytosolischen Expression in *E. coli* keine Rolle spielt.

| <u>Mutation</u> | <u>Oberfläche [\AA^2]^a</u> | <u>Hydrophobizität [OMH]^b</u> |
|-----------------|---|--|
| V-17→I* | 155→175 | 0,91→1,25 |
| H-20→K* | 195→200 | -0,64→-0,67 |
| A-22→V* | 115→155 | -0,4→0,91 |
| R-23→S | 225→115 | -0,59→-0,55 |
| Y-29→F* | 230→210 | 1,67→1,92 |

Tab. 5.1: Konservative Einzelaminosäureaustausche der Expressionskonstrukte.

Austausche, die die apparenten Expressionsausbeuten deutlich beeinflussen sind durch * gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Veränderungen einiger physikochemischer Eigenschaften bei Einführung der Mutation. Die entsprechenden Expressionskonstrukte sind in Kap. 2.5 aufgeführt.

^a Oberfläche der Aminosäure innerhalb einer Polypeptidkette [56]

^b Hydrophobizität in relativen Einheiten der OMH Skala nach Sweet und Eisenberg [303]; Daten aus [5].

Durch Abwandlung des Solubilisierungsprotokolls (Kap. 4.4.1) für die mPR3pET24c/F3a-transformierte Expressionskultur konnte jedoch das im konventionellen Laemmli-Puffer nicht detektierbare rekombinante Protein nachgewiesen werden. Dieser Befund weist darauf hin, daß die apparente Expressionseffizienz, wie sie anhand der Bandenintensität in Coomassie-Blue-gefärbten Polyacrylamidgelen bestimmt wurde, nicht der tatsächlichen Expressionsrate entspricht. Die unterschiedliche Bandenintensität wird vermutlich eher durch die unterschiedliche Löslichkeit des Einschlußkörpermaterials hervorgerufen. Warum die konservativen Mutationen zu derart unterschiedlicher Löslichkeit des rekombinanten Proteins führen, ist aus den physikochemischen Eigenschaften der einzelnen Aminosäuren nicht klar abzuleiten (Tab. 5.1). Möglicherweise summieren sich hier mehrere Effekte, die die Translationsinitiation (s. o.), mRNA-Stabilität und -Struktur und Löslichkeit des rekombinanten Materials beeinflussen [310, 191].

Ähnlich wie Neutrophilen-Elastase wird PR3 *in vivo* als Präproenzym synthetisiert und anschließend prozessiert. Das einzige, in U937-Zellen durch [³H]Isoleucin-Markierung nachgewiesene Prozessierungsintermediat beginnt mit der Sequenz Ala-Glu-Ile-Val-Gly-Gly. Das Propeptid Ala-Glu wird durch eine noch nicht identifizierte Cysteinprotease abgespalten [207]. Es konnte von verschiedenen Forschungsgruppen aber gezeigt werden, daß granuläre Serinproteasen durch Cathepsin C-vermittelte Abspaltung des Propeptids aktiviert werden können [207, 288, 182, 236]. Defizienz von funktionellem Cathepsin C ist beim Menschen mit PLS (Papillon-Lefèvre-Syndrom) assoziiert, das durch schwere Parodontitis und palmoplantare Hyperkeratose charakterisiert ist [316]. Es wird

vermutet, daß sich die Cathepsin C-Defizienz in einer gestörten Immunreaktion gegen Bakterien in den Zahnfleischtaschen manifestiert. Cathepsin C ist eine Exopeptidase, die sukzessive Dipeptide unspezifisch vom Aminoterminus von Proteinen abspaltet. Ist die zweite oder dritte Aminosäure des Proteins ein Prolin oder ist die erste Aminosäure ein Arginin oder Lysin findet keine Spaltung statt. Da solche Stopsequenzen in den genannten Serinproteasen nicht vorkommen, muß hier ein anderer Mechanismus den Abbau über den reifen N-Terminus hinaus verhindern. Murakami und Mitarbeiter postulieren, daß der Abbruch durch einen Konformationswechsel induziert wird, bei dem der freie N-Terminus durch intramolekulare Verbrückung für die Exopeptidase nicht mehr zugänglich ist [218]. Dieser Mechanismus läßt sich für die Generierung rekombinanter, aktiver Granzyme aus pro-Granzymen *in vitro* nutzen [338]. Als Propeptid wurde für pro-rmPR3 Met-Glu eingesetzt. Methionin ist als erste Aminosäure essentiell, da es vom Startkodon ATG kodiert wird, die zweite Aminosäure Glu kommt häufig in natürlichen Propeptiden von Serinproteasen (wie bei humaner PR3) vor. Dieses Dipeptid wird effizient von Cathepsin C abgespalten. N-terminale Aminosäuresequenzierung bestätigte die quantitative Abspaltung des Propeptids, es wurden keine Nebensequenzen detektiert. Konvertierte rmPR3 besitzt katalytische Aktivität, die durch den physiologischen Inhibitor von hPR3, α 1-AT inhibiert wird. Dieser Befund zeigt klar, daß das rekombinante, renaturierte Material die native Konformation besitzt und daher den oben genannten Anforderungen entspricht. Hinsichtlich der Verwendung des rekombinanten Materials als Antigen zur Herstellung von mPR3-Antikörpern bleibt zu bemerken, daß native PR3 *in vivo* C-terminal prozessiert wird [32, 130]. Das rekombinante Enzym entspricht in seiner Primärstruktur aber der nicht getrimmten Form. Die Prozessierung hat jedoch keine Auswirkungen auf die katalytische Aktivierung nah verwandter Zymogene [268, 131]. Der ausgeprägte hydrophobe Charakter von PR3 wurde für die chromatographische Reinigung genutzt. Diese Methode bedarf zur Steigerung der allgemeinen Ausbeute weiterer Optimierung: Während bis zu 2,5mg pro Liter Expressionskultur renaturierte pro-rmPR3 erhalten wurde, konnte nur ein Zehntel der eingesetzten Menge aus dem Säulenmaterial eluiert werden. Die Hydrophobizität des Enzyms bedingt sowohl Aggregation in wässriger Lösung als auch Adsorption (z. B. an Glas) [106, 343]. Diese Eigenschaften können durch den Einsatz von Detergenzien minimiert werden, die jedoch die Interaktion mit der hydrophoben Chromatographiematrix behindern. Die Entwicklung alternativer Reinigungsmethoden sollte daher deutlich höhere Ausbeuten ermöglichen.

Wird die katalytische Aktivität von PR3 durch andere Serinproteasen moduliert?

Zymogenaktivierung und Modulation biologischer Aktivität durch limitierte Proteolyse spielt bei Serinproteasen eine zentrale Rolle (z. B. [29, 202, 299, 322]). Existieren ebenfalls Wechselwirkungen zwischen den Serinproteasen neutrophiler Granulozyten Elastase, Cathepsin G und Proteinase 3, die in etwa äquimolarem Verhältnis in den azurophilen Granula gespeichert werden? Boudier und Kollegen konnten zeigen, daß Cathepsin G die elastinolytische Aktivität von Neutrophilen-Elastase gegen Elastin erhöht [33, 34]. Allerdings ist der Mechanismus umstritten [252], klar hingegen ist, daß dieser Effekt nicht durch eine Verstärkung der katalytischen Aktivität von Elastase hervorgerufen wird. Stein und Williams aber beschrieben sowohl eine tryptische Inaktivierung als auch Autolyse von Neutrophilen-Elastase [295]. Die Befunde aus Kap. 4.5.2 der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, daß möglicherweise die Aktivität sowohl des Zymogens als auch der aktiven Form von mPR3 durch humane Neutrophilen-Elastase beeinflusst wird. Zudem ist hNE in der Lage, pro-rmPR3 und rmPR3 zu spalten. Unter reduzierenden Bedingungen lassen sich zwei Fragmente von ca. 20kDa und 5kDa im Polyacrylamidgel detektieren. Diese besitzen dieselbe Größe wie die bereits nach der Renaturierung von pro-rmPR3 detektierten Fragmente (Kap. 4.4.2). Durch N-terminale Aminosäuresequenzierung konnte gezeigt werden, daß die Spaltung zwischen Ala-187 und Ala-188 (Chymotrypsinogennumerierung) erfolgt. Anhand eines computergenerierten Strukturmodells von mPR3 konnte diese Spaltstelle in einer sehr oberflächenexponierten und äußerst flexiblen Schleife lokalisiert werden (Abb. 5.1). Solche Strukturmerkmale deuten häufig auf putative, proteolytische Spaltstellen hin (vgl. z. B. α -Thrombin oder Trypsin) [30, 322]. Da Neutrophilen-Elastase und PR3 bevorzugt nach kleinen, aliphatischen Aminosäuren wie Alanin oder Valin spalten, deuten diese Befunde auf eine spezifische, proteolytische Spaltung hin. In welcher Weise diese Spaltung Einfluß auf die katalytische Aktivität ausübt, konnte nicht geklärt werden. Auffällig ist jedoch, daß das Auftreten von Spaltprodukten von pro-rmPR3 nicht direkt korreliert ist mit dem gemessenen Anstieg katalytischer Aktivität. Es ist daher nicht auszuschließen, daß der initiale Anstieg katalytischer Aktivität vom sog. „hysteretischen“ Verhalten der PR3 herrührt [7]. Diese Bezeichnung beschreibt das Phänomen, daß bei schneller Änderung des pH-Wertes, d. h. beim Überführen von saurem Lagerpuffer in alkalischen Testpuffer, die Änderung der Konformation in eine aktivere Form mit einer gewissen Latenz behaftet ist, die auch als „Proteingedächtnis“ bezeichnet wird [257]. Weiterhin kann auch die Wechselwirkung mit Substraten einen solchen Konformationswechsel bewirken (*induced fit*) [29, 7]. Möglicherweise wird PR3 auch nur durch hNE in der Lösung stabilisiert. Zwar können all diese Möglichkeiten nicht ausgeschlossen werden, als alleinige Erklärung eignen sie sich jedoch nicht:

- (1) In Kontrollansätzen ohne PR3 wurde für hNE keine vergleichbare Änderung der Aktivität beobachtet. Im Falle von hNE-vermittelter pro-rmPR3-Aktivierung ist daher ein Einfluß des „hysteretischen“ Verhaltens von hNE auf das Meßergebnis unwahrscheinlich („hysteretisches“ Verhalten wird in der Literatur für hNE ohnehin nicht beschrieben). Für pro-rmPR3 alleine wurde keinerlei Aktivität nachgewiesen.
- (2) Bei nahezu quantitativer Spaltung von rmPR3 wurde eine nahezu unveränderte katalytische Aktivität beobachtet. Da die Bruttoaktivität des Gemisches aus rmPR3 und hNE höher war als die von hNE alleine, muß auch gespaltene rmPR3 zur gemessenen Aktivität beigetragen haben. Die Versuche mit matrixgekoppelter hNE stärken diese Vermutung.

Die beschriebene Spaltung führt deshalb wohl nicht allein zu einer katalytischen Inaktivierung. Möglicherweise könnte sie einen alternativen Aktivierungsmechanismus darstellen. Es bleibt schließlich die Frage nach der biologischen Relevanz dieser Ergebnisse. Es wurde gezeigt, daß Cathepsin G nicht in der Lage ist, pro-rmPR3 zu spalten oder die Bruttoaktivität zu beeinflussen (Kap. 4.5.2). Dies spricht für eine spezifische Interaktion von NE mit PR3. Andererseits konnte eine Spaltung von hPR3 durch hNE nicht nachgewiesen werden, pro-hPR3 wurde allerdings nicht getestet. Es ist deshalb unklar, ob die beobachteten Effekte nur für rekombinantes Material aus Prokaryoten und/oder nur für mPR3 gültig sind.

Das gespaltene Enzym könnte eine veränderte Affinität zu Inhibitoren oder Substraten besitzen. Diese Vermutung ist insbesondere deshalb denkbar, da die Spaltung in der Nähe der primären Bindungsstelle für Substrate erfolgt. Das zweite Proteinfragment, das möglicherweise durch einen sekundären Abbauprozess nach der hNE-vermittelten Spaltung entsteht und im präparativen Rückfaltungsansatz bei der Proteinsequenzierung des 5kDa-Fragments als Nebensequenz nachgewiesen wurde (Kap.4.4.2), ist carboxyterminal von Gly-189 gespalten (AAG↑ICF)! Wenn eine Spaltung nach Ala-187 *in vivo* tatsächlich stattfindet, könnte ein sekundärer Abbauprozess durch eine Dipeptidylexopeptidase (z. B. Cathepsin C) zu dieser PR3-Form führen. Die Hypothese einer sequentiellen Spaltung von PR3 ist der einer alternativen Spaltung vorzuziehen, da sich Gly-189 nicht an der Moleküloberfläche befindet und somit für eine direkte Interaktion mit einem spaltenden Enzym nicht zu Verfügung steht.

Dieser Mechanismus könnte z. B. bei membranassoziierter PR3 eine Rolle spielen, die für α 1-AT nicht zugänglich ist [228, 49]. Dies könnte aber auch für die Wegener'sche Granulomatose von Bedeutung sein: Der einzige physiologische Elastase-Inhibitor SLPI (*secretory leukocyte protease inhibitor*), der PR3 nicht inhibiert, ist in besonderem Maße im oberen Respirationstrakt lokalisiert. Die fehlende Inhibition von PR3 ist vermutlich auf das Leu in P1-Position des Inhibitors zurückzuführen

[245, 107], das von NE hingegen toleriert wird (siehe Einleitung). Bei einer spaltungsbedingten Dislokation der S1-Tasche von pro-rmPR3 bzw. rmPR3 wird möglicherweise die Spezifität für den P1-Rest reduziert und damit PR3 im oberen Respirationstrakt durch SLPI inhibierbar.

Die Spaltung könnte durch c-ANCA-Bindung gestört werden (s. u.), was sowohl mit dem Krankheitsverlauf (d. h. erste Manifestation im oberen Respirationstrakt) als auch mit der PR3-Spezifität in Einklang stünde. Antigenität einer Oberflächenstruktur eines Proteins ist direkt mit Flexibilität und Exposition der Epitope korreliert [15, 117]. Die beschriebene Schleife könnte demzufolge eine Bindungsstelle für c-ANCA darstellen, die möglicherweise die Regulation der Aktivität durch NE behindern (Abb. 5.1). Tatsächlich wurden in diesem Bereich übereinstimmend in allen Publikationen c-ANCA-Epitope lokalisiert (Epitop 3: NICTFVPRRK↑AGIC aus [123, 122]; Epitop9: PRRK↑AGI aus [339], Peptid 39/40 aus [115], Pfeile deuten die Spaltstelle in der homologen Sequenz von rmPR3 an). Darüber hinaus wurde das Peptid 40 (RK↑AGICFGDSSGGPLI) bei Krankheitsrezidiven in einer Studie von van der Geld und Mitarbeitern als einziges aus einer Serie von 50 überlappenden Peptiden von c-ANCA-Seren signifikant besser gebunden als von Normalseren [115].

Die einzige in der Literatur beschriebene enzymatische Spaltung einer der drei lysosomalen Neutrophilen-Serinproteasen durch eine andere wurde für NE aus *beige*-Mausmutanten gezeigt: ein latentes 46kDa-Vorläuferprotein von hNE wird durch eine Serinprotease in ein 29kDa-Produkt mit enzymatischer Aktivität gespalten [111, 52].

Es bleibt schließlich zu bemerken, daß in dem beschriebenen Testsystem Enzyme verschiedener Spezies eingesetzt wurden. Aufgrund der hohen Homologie von NE aus Mensch und Maus ist zwar ein ähnliches Substratspektrum zu erwarten, zeigen ließe sich das aber nur durch den Einsatz von mNE, die jedoch kommerziell nicht erhältlich ist. Wird als „Substrat“ pro-rmPR3 bzw. rmPR3 eingesetzt, befindet sich an P1-Position ein Alanin. Bei hPR3 befindet sich an der gleichen Stelle hingegen ein Lysin (fett gedruckt, Nomenklatur nach [274]):

| <u>hPR3 als „Substrat“</u> | | | <u>pro-rmPR3 bzw. rmPR3 als „Substrat“</u> | | |
|----------------------------|----------------|----------------|--|----------------|----------------|
| Arg-186A* | Arg-186B | Lys-187 | Arg-186A | Arg-186B | Ala-187 |
| P ₃ | P ₂ | P ₁ | P ₃ | P ₂ | P ₁ |

*Chymotrypsinogennumerierung

Die Präferenz von hNE für kleine, aliphatische Aminosäuren an P₁ könnte daher erklären, warum nur pro-rmPR3 bzw. rmPR3 nicht aber hPR3 gespalten wird. Allerdings unterscheidet sich auch die

Substratbindetasche von hNE und mNE: Ile-190 muriner NE ist beim Menschen durch Val ersetzt, was größere Aminosäuren in P₁-Position ermöglicht. Anhand der Strukturdaten läßt sich also nicht vorhersagen, ob dieser Mechanismus *in vivo* relevant ist.

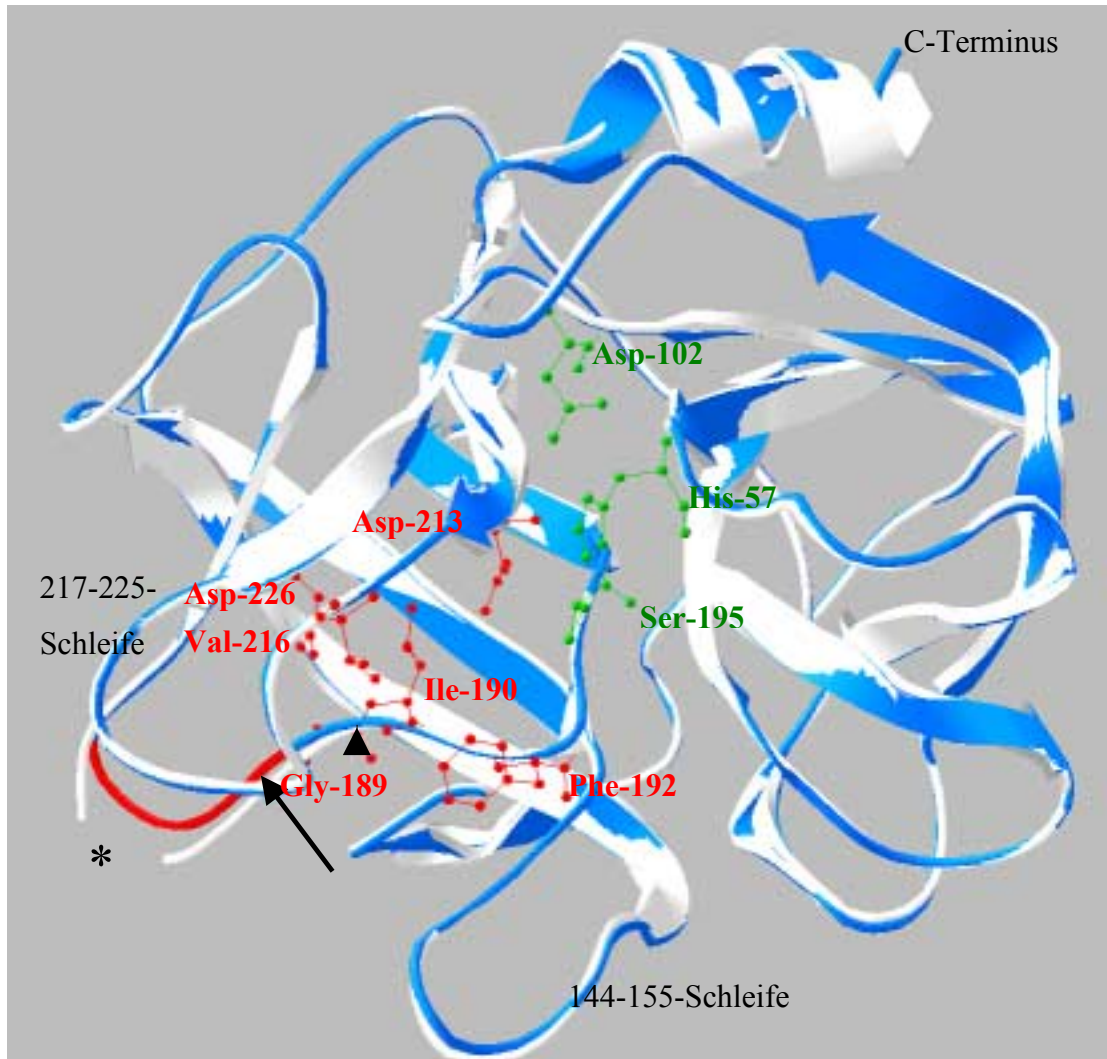


Abb.5.1: Überlagerte Strukturmodelle von hPR3 (weiß) und mPR3 (blau)

Die Struktur von mPR3 wurde nach dem sog. „first approach“-Modus (Swiss-Prot) aus den Primärstrukturdaten von mPR3 und den Kristallstrukturdaten von hPR3 erstellt [107]. Sie stellt lediglich eine Annäherung an die tatsächliche Konformation dar.

Die Seitenketten der katalytischen Triade von hPR3 sind grün, die Seitenketten der S₁-Tasche sind rot dargestellt. Der rot gezeichnete Bereich von mPR3 kennzeichnet fehlende Strukturdaten im Originaldatensatz von hPR3, vermutlich bedingt durch die hohe Flexibilität der Schleife im Kristall (unterbrochene Hauptkette bei hPR3*).

Die Spaltung nach Ala-187 ist durch einen Pfeil angedeutet. Der weitere Abbau bis einschließlich Gly-189 (Pfeilspitze) könnte vielleicht von einer (Dipeptidyl-) Exopeptidase katalysiert oder infolge der Instabilisierung des zuvor gespaltenen Enzyms bedingt sein. Die Spaltung dürfte zu einer Erhöhung der Freiheitsgrade von Ile-190 führen, das durch die Spaltung zu einem zweiten, internen N-Terminus wird. Im ungespaltenen Enzym reduziert Ile-190 die Größe der S₁-Tasche und bedingt so die Präferenz von PR3 für kleine aliphatische Reste in P₁ [107].

5.5 In PR3/NE-defizienten Mäusen lassen sich murine c-ANCA generieren

Zur Herstellung von murinem c-ANCA-Serum wurde alternativ pro-rmPR3 und rmPR3 zur Immunisierung eingesetzt. Zwar unterscheiden sich beide Antigene hinsichtlich ihrer Primärstruktur nur um zwei Aminosäuren, ihr Epitopspektrum überlappt aber nicht vollständig [302]. Zudem scheint die Antikörper-Spezifität für einzelne Epitope mit dem Krankheitsverlauf assoziiert zu sein [265]. Die unterschiedliche Epitopräsentation beruht wahrscheinlich auf der unterschiedlichen Konformation von PR3 und dessen Zymogen [107, 302]. Mit den gewonnenen Antiseren ließ sich in der vorliegenden Arbeit jedoch pro-rmPR3 von rmPR3 nicht diskriminieren. Weitere Studien mit monospezifischen Antikörpern sind notwendig, um diesen Befund bei der Maus experimentell zu bestätigen.

Bei Tieren, die mit pro-rmPR3 immunisiert wurden, konnte ein ca. 10 mal höherer rmPR3-spezifischer Antikörper-Spiegel detektiert werden, als bei rmPR3-immunisierten Mäusen. Hierfür gibt es zahlreiche spekulative Erklärungen:

- (1) pro-rmPR3 ist wesentlich thermostabiler, als rmPR3.
- (2) PR3 könnte durch natürliche Inhibitoren (z. B. α 1-AT) komplexiert und rascher abgebaut werden.
Da pro-rmPR3 kein katalytisch aktives Zentrum besitzt, sollte es nicht von Serpinen gebunden werden.
- (3) Toleranz gegenüber Epitopen beider Konformationen könnte unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Fehlende Kreuzreaktivität von humanen c-ANCA-Seren mit murinen Neutrophilen führte zu dem Schluß, daß ein PR3-Homolog in der Maus nicht existiert [126]. Es konnte aber 1997 von Jenne und Kollegen gezeigt werden, daß ein Maus-Homolog existiert, das jedoch nicht von humanen c-ANCA erkannt wird [153]. Tomer und andere beschrieben ein neues Konzept idiotypischer Dysregulation an einem Mausmodell für Wegener'sche Granulomatose. Diese Ergebnisse wurden jedoch kontrovers diskutiert, insbesondere weil Anti-Anti-idiotypische Antikörper, die durch Immunisierung mit humanen c-ANCA generiert wurden, theoretisch nicht mit muriner PR3 kreuzreagieren dürften [281, 315, 188, 22]. Die hier vorgelegten Daten beweisen indes die Spezifität der eingesetzten Antiseren für murine PR3.

Es existieren zahlreiche Tiermodelle für verschiedene Formen systemischer Vaskulitis:

- (1) „Serumkrankheit“ durch Injektion heterologen Serums oder von Serumbestandteilen [82].
- (2) Genetisch determinierter Lupus in (NZBxNZW)F1- und MRL lpr/lpr-Mäusen [145, 2].
- (3) Infektionsassoziierte Vaskulitis [162, 76].
- (4) Chemisch induzierte, ANCA-assoziierte Vaskulitis durch Quecksilberchlorid [242].

Aber keines der genannten Beispiele ist als Modell für WG geeignet noch läßt sich damit das pathogene Potential von c-ANCA experimentell beweisen. Brouwer und Kollegen konnten indes das pathogene Potential von Anti-MPO-Antikörpern an einem Rattenmodell belegen: Sie konnten nach Immunisierung von *Brown-Norway*-Ratten mit humaner MPO Antikörper im Serum nachweisen, die mit MPO der Ratte kreuzreagierten. Durch Perfusion der Niere dieser Tiere mit Neutrophilen-Extrakt und Wasserstoffperoxid oder einer renalen Ischämie wurde eine NCGN (*necrotizing crescentic glomerulonephritis*) erzeugt, die bei nicht immunisierten Kontrolltieren nicht zu beobachten war. [41, 42]. Desweiteren konnten sie durch systemische Verabreichung von Neutrophilen-Extrakt an MPO-immunisierte Mäuse eine Vaskulitis in der Lunge und dem Darm erzeugen [141]. Glomerulonephritis, die bei Menschen stark mit p-ANCA assoziiert ist, konnte jedoch bei letzterem Modell nicht beobachtet werden. Yang und Mitarbeiter stellten zudem fest, daß die induzierten Läsionen eher einer Immunkomplex vermittelten Glomerulonephritis als einer ANCA-assoziierten Krankheit ähneln [346]. Weiterhin konnte aufgrund der aktiven Immunisierung mit MPO die Wirkung von p-ANCA nicht direkt bewiesen werden.

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellte pro-rmPR3- oder rmPR3-Antiserum sollte hingegen erlauben, das pathogene Potential von c-ANCA *in vitro* und *in vivo* zu analysieren. Durch *Western Blotting* (Kap.4.6.2 a) und indirekte Immunfluoreszenzfärbung von PFA-fixierten Maus-Neutrophilen (Kap.4.6.2 b) wurde die Spezifität für murine PR3 der gewonnenen Antiseren belegt. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß das Serum Reaktivität mit Epitopen aufweist, die auf der Membran von stimulierten Neutrophilen exponiert sind (Kap. 4.6.3). Einzig der Nachweis eines c-ANCA-Färbemusters auf Alkohol-fixierten Maus-Neutrophilen gelang nicht. Die wahrscheinlichste Ursache hierfür ist die Nettoladung muriner PR3: unter der Annahme, daß mPR3 wie hPR3 C-terminal prozessiert wird, besitzt mPR3 eine negative Nettoladung von -0,98 während hPR3 eine positive Nettoladung von +3,34 aufweist [6]. Murine PR3 dürfte deshalb vermutlich eine schwächere Wechselwirkung mit der negativ geladenen Proteoglykanmatrix der Neutrophilen-Granula eingehen und wird bei der milden Fixierung oder den folgenden Inkubationsschritten ausgewaschen. Im Gegensatz zur Alkohol-Fixierung dürfte dieser Unterschied bei Verwendung eines stark quervernetzenden Fixationsagens' (Formaldehyd) keine Rolle spielen.

Auch die funktionelle Analogie zu humanen c-ANCA-Seren konnte durch Antiserum-induzierte Aktivierung stimulierter neutrophiler Granulozyten nicht gezeigt werden. Die Konzentration von Antikörpern, die oberflächenexprimierte PR3-Epitope erkennen, könnte nicht ausreichend sein, um ihre aktivierende Wirkung *in vitro* nachweisen zu können. Gegen diese Vermutung spricht aber, daß die Bindung von PR3-spezifischen IgG fluoreszenzzytometrisch klar bestätigt werden konnte.

Zwischen dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten und den in der Literatur beschriebenen Testsystemen besteht jedoch ein möglicherweise wichtiger Unterschied: humane c-ANCA-Seren könnten auch Antikörper-unabhängig zur Stimulation oder Aktivierung beitragen (z. B. durch höhere Zytokinspiegel [169]). Zirkulierende Neutrophile von c-ANCA-positiven Patienten weisen bereits eine erhöhte Oberflächenexpression von Aktivierungsmarkern auf (s. u.). Dieser Aktivierungsstatus kann nicht direkt durch c-ANCA hervorgerufen werden, da bei nicht stimulierten Neutrophilen das Antigen PR3 nicht zugänglich ist. Diese Granulozyten-stimulierenden Faktoren in humanen c-ANCA-Seren könnten den Aktivierungseffekt daher verstärken. Beim murinen c-ANCA-Serum dürften diese Faktoren nicht vorhanden sein, da bei der Immunisierung PR3/NE-defizienter Mäuse keine Autoimmunreaktion, d. h. keine systemische Entzündungsreaktion (Vaskulitis) hervorgerufen wird. Im Vergleich zu aufgereinigten Antikörperfraktionen hat das Serum auch den Nachteil hoher α 1-AT-Konzentrationen, das die c-ANCA-vermittelte Aktivierung von Neutrophilen hemmt [260]. Die Verwendung aufgereinigter IgG-Fraktionen des pro-rmPR3- oder rmPR3-Antiserums könnte darüber Aufschluß geben. Eine Aufreinigung konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgrund der geringen Serummengen jedoch nicht durchgeführt werden.

5.6 Systemisch verabreichte mc-ANCA-Seren induzieren in Wildtyp-Mäusen keine Symptome der Wegener'schen Trias

Durch die wiederholte intravenöse Injektion von mc-ANCA-Serum ließ sich in Wildtyp-Mäusen ein über 10 Wochen persistierender mPR3-spezifischer IgG-Spiegel bei einer Verdünnung von 1:2000 nachweisen. Pathologische Veränderungen in der Lunge oder Niere konnten jedoch nicht festgestellt werden. In den untersuchten Organen wurde außerdem keine Vaskulitis beobachtet. Welche Schlußfolgerung läßt sich daraus ziehen? Sind c-ANCA alleine, d. h. ohne einen weiteren, vielleicht auch exogenen Faktor nicht pathogen? Das negative Ergebnis spricht zwar dafür, allerdings fehlt für den Beweis dieser Hypothese eine Positivkontrolle. Das Ausgangsmaterial, pro-rmPR3- bzw. rmPR3-Antiserum, genügt den bisher erforschten Charakteristika von c-ANCA (s. Einleitung), insbesondere Bindung von IgG an oberflächenexponierte PR3-Epitope auf neutrophilen Granulozyten. Das Fehlen von Symptomen der Wegener'schen Trias könnte aber durch das experimentelle Vorgehen bedingt sein:

■ Ist der mPR3-Antikörperspiegel hoch genug?

C-ANCA-Spiegel sind korreliert mit dem Krankheitsverlauf, oft lassen sich Rezidive durch einen Anstieg vorhersagen. Antikörperspiegel von >1:20 gelten in der klinischen Diagnose bereits als

Kriterium für WG. Während der Initialphase der Erkrankung, d. h. im Stadium granulomatöser Veränderungen im oberen Respirationstrakt ohne Vaskulitis lassen sich bei ca. 50% der Patienten c-ANCA nachweisen, in der generalisierten Phase bei ca. 95% [223].

Wie in Kap. 4.6.5 b gezeigt, ließen sich bei den passiv immunisierten Mäusen während des gesamten Behandlungszeitraums rmPR3-Antikörper bei einer Serumverdünnung von 1:2000 nachweisen. Anhand der Standardkurve in Abb. 4.14 läßt sich am niedrigsten Meßwert ein minimaler Antikörperspiegel zwischen 1:40 und 1:120 abschätzen. Der durchschnittliche Antikörperspiegel muß, wie die in Abb. 4.22 dargestellten Daten zeigen, ein vielfaches davon betragen. Allerdings ist nicht bekannt, in welchem Ausmaß eine kontinuierliche *Clearance* von c-ANCA bei WG-Patienten stattfindet.

Hattar und Mitarbeiter konnten zeigen, daß sehr niedrige c-ANCA-Konzentrationen zu einer erhöhten Chemotaxis neutrophiler Granulozyten *in vitro* führt [139]. Dieser Befund könnte vor allem in der ersten Krankheitsphase von Bedeutung sein, würde er doch die geringe Assoziation von c-ANCA-Spiegeln mit dem frühen Krankheitsbild erklären. Träfe dies zu, sollten die transferierten Antikörperspiegel im Mausmodell genügen.

■ Gibt es pathogene Epitope, die von mc-ANCA-Serum nicht erkannt werden?

Die Analyse des Epitopspektrums humaner c-ANCA mit synthetischen, überlappenden PR3-Peptiden lieferte keine eindeutigen Hinweise auf ein einzelnes dominantes, pathogenes Epitop, das bei allen c-ANCA-positiven WG-Patienten zu finden ist [115]. Auch über direkte biochemische Analysen ließ sich eine Beeinträchtigung der funktionellen Eigenschaften der PR3 in Anwesenheit von c-ANCA nicht zweifelsfrei nachweisen: es wurde vorgeschlagen, daß c-ANCA mit der Bildung von PR3- α 1-AT-Komplexen interferieren und die enzymatische Aktivität hemmen können [83, 73]. Diese Befunde konnten von anderen aber nicht reproduziert werden [16].

Die wenigen gesicherten Erkenntnisse zu möglichen Pathomechanismen von c-ANCA weisen eher darauf hin, daß die Bindung von c-ANCA an die Plasmamembran PR3-exprimierender Zellen (insbesondere neutrophile Granulozyten) zur aberranten Aktivierung derselben und von Neutrophilen und/oder Makrophagen führt [96, 282, 213]. In der vorliegenden Arbeit konnte die Bindung von (pro)-rmPR3-Antikörpern an stimulierte Neutrophile durch Fluoreszenzzytometrie nachgewiesen werden. Ob für die Aktivierung der Neutrophilen schließlich bestimmte Epitope erkannt werden müssen, ist bislang unklar.

■ Sind nur spezielle Antikörper-Isotypen pathogen?

C-ANCA sind gewöhnlich vom Isotyp G (IgG), andere Isotypen wurden aber ebenfalls beobachtet [165]. Ferner sind insbesondere IgG3-Spiegel mit dem klinischen Verlauf der Krankheit assoziiert [151]. Es konnte gezeigt werden, daß bei der c-ANCA-vermittelten Aktivierung stimulierter neutrophiler Granulozyten sowohl $F_c\gamma RIIa$ als auch $F_c\gamma RIIIb$ beteiligt sind, die auf der Plasmamembran konstitutiv exprimiert werden [240, 177]. Sie besitzen hohe Spezifität für IgG1 und IgG3, können aber auch andere Subisotypen mit geringerer Avidität binden [341]. Eine genetische Disposition für WG bezüglich $F_c\gamma RIIa$ - und $F_c\gamma RIIIb$ -Polymorphismen liegt aber offensichtlich nicht vor [320, 319].

Eine Subspezifikation der Ig-Isotypen der verwendeten Antiseren wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt. Da es keine direkten Beweise bezüglich der Subisotypen (insbesondere bei Mäusen!) gibt, die für das pathogene Potential von c-ANCA zwingend sind, erschien eine weitere Klassifizierung nicht sinnvoll. Nach dem aktuellen Wissenstand kann ohnehin nicht eine ausschließlich $F_c\gamma$ -Rezeptor vermittelte Aktivierung gefolgert werden. Reumaux und Kollegen konnten z. B. zeigen, daß β_2 -Integrine an der ANCA-vermittelten Aktivierung beteiligt sind [256]. Zudem deutet die Aktivierung von Neutrophilen durch Anti-PR3-F(ab')₂-Fragmente zumindest neben Fc-Rezeptor-vermittelter Aktivierung auch auf alternative Antikörper-abhängige Aktivierungswege hin [96, 170].

■ Sind Mäuse generell oder der verwendete Mausstamm resistent?

Die Erforschung des pathogenen Potentials von Anti-Neutrophilen-Antikörpern wurde bisher ausschließlich am menschlichen System *in vitro* durchgeführt. Der vermutete Pathomechanismus der ANCA-induzierten Vaskulitis, nämlich die Aktivierung von Neutrophilen, Freisetzung von zytotoxischen Sauerstoffradikalen und lytischer Enzyme, führt zur Schädigung von Gewebe. In der vorliegenden Arbeit wurde die Neutrophilen-vermittelte Schädigung von Endothel im Maussystem nicht experimentell nachgewiesen. Auch konnte die ANCA-induzierte Aktivierung von Neutrophilen *in vitro* nicht belegt werden. Noch nicht erforschte, Maus-spezifische Schutzmechanismen (z. B. ein zusätzlicher Regulationsmechanismus der PR3-Aktivität durch Elastase?, Kap. 5.4) sind zwar nicht auszuschließen aber recht unwahrscheinlich. Speziesspezifische Unterschiede des Expressionsmusters des NE-Inhibitors SLPI (*secretory leukocyte protease inhibitor*) zwischen Mensch und Maus sind allerdings beschrieben worden: im Gegensatz zum murinen SLPI konnte dessen humanes Homolog nicht in Makrophagen nachgewiesen werden [158]. Da SLPI aber bei Mensch und Maus im Lungenepithel vorkommt, scheint diese Erklärung eher unwahrscheinlich.

Bleibt die Frage, ob bestimmte, genetische Faktoren beim Menschen für eine Prädisposition sorgen, die im verwendeten Mausstamm nicht dargestellt werden kann. Die zwei wichtigsten, bekannten genetisch determinierten Dispositionen sind

- a) α 1-AT-Polymorphismus: Der Plasmaspiegel von α 1-AT wird durch kodominante Allele von PI (*proteinase inhibitor*) kontrolliert. Heterozygote Träger des Z-Allels (heterozygot PiZ, homozygot PiZZ) weisen nur etwa 50-60% des normalen Inhibitorspiegels auf [38]. Für sie wurde ein erhöhtes Risiko beschrieben, unter anderem an systemischer Vaskulitis zu erkranken [93, 87]. Ein Ungleichgewicht von Inhibitor zu Serinproteasen wird als mögliche Ursache für das erhöhte Risiko diskutiert.
- b) Konstitutive Oberflächenexpression von PR3 [344]: Ob dieses Charakteristikum genetische Ursachen hat, konnte bislang nicht zweifelsfrei geklärt werden. Gencik und Mitarbeiter vermuten, daß durch einen krankheitsassoziierten Alanin/Guanin-Polymorphismus im PR3-Promotorbereich eine neue Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Sp1 entsteht, der die Überexpression von PR3 auf der Membranoberfläche von Neutrophilen erklären könnte [116].

Detaillierte Studien zu α 1-AT-Polymorphismen und PR3-Promotorpolymorphismen in verschiedenen Mausstämmen sind in der Literatur nicht beschrieben. Da aber die beschriebenen Faktoren zwar die Krankheitsentstehung begünstigen, aber nicht notwendig sind, sollte WG auch im Mausmodell darstellbar sein. Bisher nicht entdeckte Determinanten sind allerdings vorstellbar.

■ War die Expositionsdauer lange genug?

Die Wegener'sche Granulomatose verläuft in zwei Phasen: die erste Phase ist lokal begrenzt und kann über Monate oder manchmal Jahre anhalten [128]. Die außerordentliche Variabilität der Krankheitsmanifestation macht eine Erstdiagnose vor allem in der Initialphase äußerst schwierig. Wie im vorigen Abschnitt bereits erwähnt, ist auch die Korrelation zu c-ANCA-Spiegeln in der Frühphase der Krankheit schwächer ausgeprägt. Erkenntnisse über c-ANCA-Spiegel vor dem Erstausbruch von WG liegen nicht vor.

Ob und in welchem Zeitraum mc-ANCA unter konventionellen Haltungsbedingungen (Umweltkeime könnten einen exogenen Stimulationsfaktor darstellen) Symptome der Wegener'schen Trias in der Maus auslösen, läßt sich deshalb nicht abschätzen. Die im folgenden Kapitel besprochenen Ergebnisse legen nahe, daß durch Stimulation, z. B. mit LPS, die Expositionszeit verkürzt werden kann.

■ Sind endogene Kofaktoren notwendig?

In den granulomatösen Läsionen bei WG-Patienten findet man vor allem Zellen der monomyelozytären Linie zusammen mit Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten. Es wird vermutet, daß Th1-Zellen für die Initiation und Aufrechterhaltung der chronischen inflammatorischen Foki eine wichtige Rolle spielen [196, 67]. Allerdings ist der Mechanismus, der für die Polarisierung in Richtung Th1 verantwortlich ist, unbekannt. Außerdem konnten expandierte T-Zellpopulationen mit einer erhöhten Expression von Aktivierungsmarkern HLA-DR und CD25 nachgewiesen werden [119]. Moins-Teisserenc und Mitarbeiter beschrieben außerdem eine Korrelation von genetisch determinierter, verminderter Expression von HLA Klasse I Molekülen bei Patienten mit Wegener-ähnlichen Symptomen [211].

Granulome werden in zahlreichen Infektionskrankheiten wie Lepra beobachtet. Es wird vermutet, daß T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Granulomen spielen, so auch bei WG. Es wurden allerdings bisher keine PR3-Peptide identifiziert, die ausschließlich die Proliferation von T-Zellen von WG-Patienten induzieren [113]. Murine c-ANCA könnten somit zwar notwendig aber nicht hinreichend für die Induktion Wegener-ähnlicher Symptome in der Maus sein.

Verschiedene Studien legen nahe, daß c-ANCA Endothelzellen aktivieren können [204, 205, 36, 159, 282]. Ob nicht myeloische Zellen das relevante Autoantigen exprimieren, wird aber bislang kontrovers diskutiert [203, 172, 230]. Sollten die Folgerungen von Mayet und Kollegen und Schwarting und Kollegen zutreffen, d. h. Expression von PR3 in Endothelzellen und glomerulären Epithelzellen stattfinden, könnte dies einen fundamentalen Einfluß auf die Pathogenese der WG ausüben [276]. Entsprechende Untersuchungen in der Maus wurden aber bisher nicht durchgeführt.

■ Findet eine c-ANCA-vermittelte Aktivierung von Neutrophilen *in vivo* statt?

Bei aktivierten Endothelzellen ist die Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen erhöht. Adhärente Zellen können bei Patienten von c-ANCA aktiviert werden, was durch den Nachweis von Wasserstoffperoxid-produzierenden Zellen in Nierenbiopsien von Vaskulitis-Patienten gezeigt wurde [43]. Was die c-ANCA-vermittelte Aktivierung, d. h. verstärkte Oberflächenexpression von Zelladhäsionsmolekülen, zirkulierender Neutrophiler betrifft, gehen die experimentellen Daten in der Literatur auseinander [135, 216]. Muller-Kobold und Mitarbeiter postulieren eine partielle, nicht aber vollständige Aktivierung von zirkulierenden Neutrophilen in Patienten mit Wegener'scher Granulomatose, da zwar verstärkte Oberflächenexpression von Aktivierungsmarkern (CD63, CD66b) nicht aber von Zelladhäsionsmolekülen beobachtet wurde [216]. Ein Nachweis von Zelladhäsionsmolekülen erschien deshalb nicht sinnvoll; der Nachweis von Aktivierungsmarkern war

nicht möglich, da Maus-spezifische Antikörper für CD63 und CD66b kommerziell nicht erhältlich waren. Der Nachweis aktivierter Neutrophiler in den Organen war ohnehin nicht möglich, da keine Neutrophileninfiltrate gefunden wurden.

Ob *in vivo* eine Aktivierung stattfindet konnte also experimentell nicht geklärt werden. Einen Hinweis liefert jedoch die Berechnung der Halbwertszeit der transferierten mPR3-spezifischen IgG: Fände eine Aktivierung statt, dürfte der PR3-spezifische Antikörperspiegel eine verkürzte Halbwertszeit im Blut aufweisen, da kontinuierlich Antikörper aus der Zirkulation durch Komplexbildung verschwinden würden. Dies ist jedoch nicht der Fall.

■ Ist ein externer, auslösender Kofaktor notwendig?

Eine essentielle Voraussetzung für die Interaktion von c-ANCA mit dem Autoantigen PR3 ist die Stimulation von Neutrophilen und die damit verbundene Translokation von PR3 an die Zelloberfläche. Die Stimulation kann *in vivo* durch proinflammatorische Mediatoren erfolgen, die bei Infektionen oder bei Gewebeschädigung freigesetzt werden. Primärinfektionen werden deshalb als auslösender Faktor von WG angesehen [237]. Diese Vermutung wird durch zahlreiche klinische Beobachtungen gestützt. Die meisten Patienten klagen vor dem Auftreten der ersten Symptome über Grippe-ähnliche Beschwerden und die Behandlung mit Antibiotika führt oft zu einer Verbesserung des klinischen Bildes [94, 293]. Zudem wurde eine signifikante saisonale Variation für das Auftreten der ersten Symptome von WG, vor allem in den Wintermonaten, beschrieben [94]. Stegeman und Kollegen fanden weiterhin, daß eine chronische, nasale Infektion mit *Staphylokokkus aureus* einen Risikofaktor für WG darstellt [294]. Daß c-ANCA alleine für den Ausbruch der Krankheit nicht hinreichend sind, wird durch eine weitere klinische Beobachtung erhärtet: In klinischen Studien wurden in der Remission befindliche Patienten mit hohem c-ANCA-Spiegel beobachtet [247]. Die in Kap. 1.4 beschriebenen *in vitro* gewonnenen Daten führten zusammen mit den hier genannten Befunden zu der These, daß als Auslöser für WG und für eine Exazerbation eine Primärinfektion notwendig ist [127]. Zur Darstellung der Wegener'schen Trias in der Maus könnte also eine Kostimulation, z. B. durch Inhalation von LPS, notwendig sein. Sollten dann WG-Symptome auftreten, wäre die Hypothese am Mausmodell bewiesen. Eine Kostimulation wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit, wie im folgenden Abschnitt beschrieben, in der Haut vorgenommen. Wegen der einfacheren Durchführbarkeit wurde dieses Modell dem ersteren vorgezogen. Zudem manifestiert sich WG in 35-50% der Fälle auch in der Haut [74].

5.7 mc-ANCA verstärken eine lokale Entzündungsreaktion

Ziel dieses Versuches war es, durch die Induktion einer schwachen, lokalen entzündlichen Reaktion ein lokales "priming" zu erreichen. Dieses "priming" sollte sowohl zirkulierende Blutzellen als auch Endothelzellen einbeziehen. Durch die lokale Applikation eines schwachen Stimulus sollte es nach dem bisherigen Kenntnisstand zu einer vermehrten Adhäsion von Zellen, insbesondere neutrophiler Granulozyten, als auch zur Stimulation des Endothels kommen. Gleichzeitig durfte der Stimulus selbst nicht zur Aktivierung neutrophiler Granulozyten führen.

Die Haut wurde als Zielorgan einer lokalen Entzündungsreaktion gewählt, da sie leicht zugänglich ist und weitere detaillierte, minimalinvasive Studien über die Auswirkungen systemischer c-ANCA auf intra- und extravaskuläre Prozesse z. B. durch Intravitalmikroskopie erlaubt. Außerdem ist bei der WG in etwa der Hälfte der Fälle auch die Haut betroffen [74]. Eine direkte Korrelation charakteristischer Hautläsionen mit dem Krankheitsverlauf wurde ebenfalls beschrieben [14].

Als proinflammatorisches Agens wurde aus verschiedenen Gründen murines TNF α gewählt:

1. TNF α führt zur Oberflächenexpression des Zielantigens PR3 auf der Plasmamembran neutrophiler Granulozyten [64]. Die Oberflächenexpression ermöglicht so die Interaktion mit c-ANCA, die zur Aktivierung der Granulozyten führt [96].
2. TNF α übt chemotaktische Aktivität gegenüber Phagozyten aus und stimuliert deren Adhäsion an das Endothel [110, 210]. Die Adhäsion über Zelloberflächenmoleküle an das Endothel dürfte ein wichtiger Kofaktor für die c-ANCA-vermittelte Aktivierung von Neutrophilen sein [256].
3. Bei WG-Patienten ist der TNF α -Spiegel im Blut und in geschädigtem Gewebe erhöht [225].
4. Moosig und Mitarbeiter beobachteten außerdem, daß die Phagozytose c-ANCA-opsonisierter apoptotischer Neutrophiler von einer verstärkten TNF α -Freisetzung begleitet ist, die zur weiteren Rekrutierung inflammatorischer Zellen beitragen könnte [213].

Sowohl experimentelle Daten als auch klinische Befunde sprechen also für eine Beteiligung von TNF α an der Pathogenese bei WG. Welcher der genannten Mechanismen für die in dieser Arbeit gefundene Verstärkung der Pannikulitis verantwortlich ist, muß in weiteren Studien untersucht werden.

Die vorgestellten Ergebnisse lassen vermuten, daß mc-ANCA generell zu einer Verstärkung einer lokalen Entzündungsreaktion führen. Diese Folgerung könnte demnach erklären, warum sich die Krankheit in der initialen Phase an Organen mit starker Antigenexposition und hohem Neutrophilenvorkommen (obere Atemwege, Lunge; der Verdauungstrakt ist dagegen offensichtlich geschützt) manifestiert. Eine lokale Entzündungsreaktion könnte sich schließlich zu systemischer Vaskulitis ausweiten, wenn steigende Antikörperspiegel zu einer intravaskulären Aktivierung neutrophiler Granulozyten führen und/oder zur Aktivierung von Makrophagen und Freisetzung von

proinflammatorischen Zytokinen beitragen. Daß TNF α ein wichtiger Faktor bei der Granulomgenese bei z. B. Tuberkulose oder Bilharziose ist, ist seit längerem bekannt [171, 3]. Ein Modell für die Granulomentstehung bei der WG wurde aber bis heute nicht vorgeschlagen. Inwieweit zudem c-ANCA an der Induktion von Granulomen bei der Wegener'schen Granulomatose beteiligt sind, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch nicht zweifelsfrei geklärt werden. Gefäßunabhängige, granulomähnliche Strukturen und 2 mikroabszessähnliche Läsionen, wie sie bei jeweils einer der insgesamt 5 Antiserum-behandelten Mäuse in Kap. 4.7 gefunden wurden, könnten jedoch darauf hinweisen, daß mc-ANCA und TNF α an der Entstehung von Granulomen bei WG beteiligt sind. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß die beobachteten Läsionen mechanisch hervorgerufen wurden (Spritzengranulome!). Um diesen Befund statistisch abzusichern, wäre eine größere Versuchstiergruppe erforderlich.

5.8 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde das pathogene Potential von Anti-PR3-Antikörpern am Tiermodell dargestellt. Die erhaltenen Ergebnisse lassen auch erste vorläufige Schlüsse zur Induktion der Krankheit zu: offensichtlich reichen c-ANCA alleine nicht aus, um Wegener'sche Granulomatose auszulösen. Entsprechend dem in der Literatur vorgeschlagenen Modell scheint tatsächlich ein exogener Reiz notwendig zu sein. Das Tiermodell scheint darüberhinaus geeignet, der Pathogenese zugrundeliegende Mechanismen genauer zu untersuchen. Die gute Zugänglichkeit des Biopsiematerials (Haut) und die strikte Definierung des exogenen Initialreizes (TNF α) dürften hierbei von großem Vorteil sein. Es ließe sich der Versuchsaufbau auch auf andere Hautbezirke (z. B. am Ohr) erweitern, das dann die intravitalmikroskopische Untersuchung des betroffenen Areal ermöglicht. Die geleisteten Vorarbeiten könnten zur Etablierung eines Mausmodells mit systemischer Vaskulitis z. B. durch adoptiven Transfer von Immunzellen aus dem Knochenmark oder der Milz beitragen.

Die vorliegende Arbeit liefert überdies Hinweise, daß ein NE-vermittelter, alternativer Aktivierungsmechanismus von pro-PR3 und/oder Modulation des PR3-Substrat- und/oder Inhibitorspektrums existieren könnte. Wie in Kap. 5.4 ausgeführt, könnte dieser Mechanismus auch für die Wegener'sche Granulomatose von Bedeutung sein. Ließen sich diese Befunde für humane PR3 bestätigen, könnte das zur Aufklärung der Pathogenese von WG direkt beitragen und die Entwicklung alternativer Behandlungsmethoden von Patienten eröffnen.

Aufgrund der hohen Homologie von muriner und humaner PR3 dürfte sich das im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Protokoll zur rekombinanten Herstellung von muriner PR3, mit evtl. geringen Modifikationen, auch auf dessen humanes Homolog übertragen lassen. Dies dürfte auch für die klinische Diagnostik hilfreich sein. Sie wäre dann nicht mehr auf das teure und inhomogene Material aus neutrophilen Granulozyten angewiesen. Darüber hinaus dürfte nun die Kartierung von pathogenen Epitopen der PR3 durch den Austausch einzelner oberflächenexponierter PR3-Epitope in den Expressionskonstrukten möglich sein.

Die Studien an PR3/NE-defizienten Mäusen beweisen die Beteiligung von PR3 und NE an der Entwicklung einer immunkomplexvermittelten Hypersensitivitätsreaktion. Durch Kombination dieses Modells mit den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Antisera ließe sich die Rolle der PR3 sowohl als Autoantigen als auch dessen Beteiligung an der Gewebeschädigung genauer untersuchen. Die Ergebnisse des Phagozytoseexperiments legen nahe, daß unter bestimmten Bedingungen, vielleicht bei einer Wechselwirkung zwischen Proteoglykanen von Endothelzellen und Neutrophilen, NE und/oder PR3 die Phagozytoseleistung beeinflussen. Dieser Befund unterstreicht, daß PR3 und/oder NE bei der Rekrutierung oder Aktivierung neutrophiler Granulozyten ohne direkte Wechselwirkung mit Endothelzellen z. B. via Adhäsionsmolekülen beteiligt sind.

6 Literatur

1. Abbink, J. J., Kamp, A. M., Nuijens, J. H., Swaak, T. J., Hack, C. E. (1993). Proteolytic inactivation of alpha 1-antitrypsin and alpha 1-antichymotrypsin by neutrophils in arthritic joints. *Arthritis Rheum.* **36**, 168-180.
2. Alexander, E. L., Moyer, C., Travlos, G. S., Roths, J. B., Murphy, E. D. (1985). Two histopathologic types of inflammatory vascular disease in MRL/Mp autoimmune mice. Model for human vasculitis in connective tissue disease. *Arthritis Rheum.* **28**, 1146-1155.
3. Amiri, P., Locksley, R. M., Parslow, T. G., Sadick, M., Rector, E., Ritter, D., McKerrow, J. H. (1992). Tumour necrosis factor α restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature* **356**, 604-607.
4. Arthus, M. (1903). Injections répétées de sérum de cheval chez le lapin. *C. R. Soc. Biol.* **55**, 817-825.
5. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (1999). Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons Inc. NY.
6. Aveskogh, M., Lützelshwab, C., Huang, M. R., Hellman, L. (1997). Characterization of cDNA clones encoding mouse proteinase 3 (myeloblastine) and cathepsin G. *Immunogenetics* **46**, 181-191.
7. Baici, A., Szedlaczek, S. E., Früh, H., Michel, B. A. (1996). pH-dependent hysteretic behaviour of human myeloblastin (leucocyte proteinase 3). *Biochem. J.* **317**, 901-905.
8. Ballieux, B. E., Hiemstra, P. S., Klar-Mohamad, N., Hagen, E. C., van Es, L. A., van der Woude, F. J., Daha, M. R. (1994). Detachment and cytolysis of human endothelial cells by proteinase 3. *Eur. J. Immunol.* **24**, 3211-3215.
9. Banda, M. J., Rice, A. G., Griffin, G. L., Senior, R. M. (1988). The inhibitory complex of human α 1-proteinase inhibitor and human leukocyte elastase is a neutrophil chemoattractant. *J. Exp. Med.* **167**, 1608-1615.
10. Bangalore, N., Travis, J., Onunka, V. C., Pohl, J., Shafer, W. M. (1990). Identification of the primary antimicrobial domains in human neutrophil cathepsin G. *J. Biol. Chem.* **265**, 13584-13588.
11. Bank, U., Ansorge, S. (2001). More than destructive: neutrophil-derived serine proteases in cytokine bioactivity control. *J. Leukoc. Biol.* **69**, 197-206.
12. Bank, U., Küpper, B., Reinhold, D., Hoffman, T., Ansorge, S. (1999). Evidence for a crucial role of neutrophil-derived serine proteases in the inactivation of interleukin-6 at sites of inflammation. *FEBS lett.* **46**, 235-240.
13. Bank, U., Reinhold, D., Schneemilch, C., Kunz, D., Synowitz, H. J., Ansorge, S. (1999). Selective proteolytic cleavage of IL-2 receptor and IL-6 receptor ligand binding chains by neutrophil-derived serine proteases at foci of inflammation. *J. Interferon Cytokine Res.* **19**, 1277-1287.
14. Barksdale, S. K., Hallahan, C., Kerr, G. S., Fauci, A. S., Stern, J. B., Travis, W. D. (1995). Cutaneous pathology in Wegener's granulomatosis. *Am. J. Surg. Pathol.* **19**, 161-172.
15. Barlow, D. J., Edwards, M. S., Thornton, J. M. (1986). Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. *Nature* **322**, 747-748.
16. Baslund, B., Szpirt, W., Eriksson, S., Elzouki, A.-N., Wiik, A., Wieslander, J., Petersen, J. (1996). Complexes between proteinase 3, α 1-antitrypsin and proteinase 3 anti-neutrophil cytoplasm autoantibodies: a comparison between α 1-antitrypsin PiZ allele carriers and non-carriers with Wegener's granulomatosis. *Eur. J. Clin. Invest.* **26**, 786-792.

17. Bassoe, C.-F. (1984). Flow cytometric studies on phagocyte function in bacterial infections. *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. C* **92**, 167-171.
18. Baumann, U., Köhl, J., Tschernig, T., Schwerter-Strumpf, K., Verbeek, J. S., Schmidt, R. E., Gessner, J. E. (2000). A codominant role of Fc γ RI/III and C5aR in the reverse Arthus reaction. *J. Immunol.* **164**, 1065-1070.
19. Belaouaj, A., Kim, K. S., Shapiro, S. D. (2000). Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. *Science* **289**, 1185-1187.
20. Belaouaj, A., McCarthy, R., Baumann, M., Gao, Z., Ley, T. J., Abraham, S. N., Shapiro, S. D. (1998). Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nature Med.* **4**, 615-618.
21. Belaouaj, A., Moog-Lutz, C., Just, J., Houzel-Charavel, A., Shapiro, S. D., Cayre, Y. (1999). Genomic organization and chromosomal localization of mouse proteinase 3 (myeloblastin). *Mam. Genome* **10**, 210-212.
22. Béliveau, A., Dagenais, P., Ménard, H. A. (1997). Finding a valid model for antineutrophil cytoplasmic antibody-related vasculitis: comment on the article by Tomer et al and the letter by Langford and Sneller. *Arthritis Rheum.* **40**, 986-987.
23. Berger, S. P., Seelen, M. A., Hiemstra, P. S., Gerritsma, J. S., Heemskerk, E., van der Woude, F. J., Daha, M. R. (1996). Proteinase 3, the major autoantigen of Wegener's granulomatosis, enhances IL-8 production by endothelial cells *in vitro*. *J. Am. Soc. Nephrol.* **7**, 694-701.
24. Bernardez-Clark de, E., Georgiou, G. (1991). Inclusion bodies and recovery of proteins from the aggregated state. In *Protein refolding*. S. 1-20. American Clinical Society, Washington D. C.
25. Bini, P., Gabay, J. E., Teitel, A., Melchior, M., Zhou, J. L., Elkon, K. B. (1992). Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in Wegener's granulomatosis recognize conformational epitope(s) on Proteinase 3. *J. Immunol.* **149**, 1409-1415.
26. Birnboim, H.C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513-1522.
27. Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., Cerretti, D. P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumor-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* **385**, 729-733.
28. Blum, H., Beier, H., Gross, H. J. (1987). Improved silverstaining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
29. Bode, W., Meyer, E., Powers, J. C. (1989). Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: X-ray crystal structures, mechanisms, substrate specificity, and mechanism-based inhibitors. *Biochemistry* **28**, 1951-1963.
30. Bode, W., Turk, D., Karshikov, A. (1992). The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human α -thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. *Protein Sci.* **1**, 426-471.
31. Bories, D., Raynal, M.-C., Solomon, D. H., Darzynkiewicz, Z., Cayre, Y. E. (1989). Down-regulation of a serine protease, Myeloblastin, causes growth arrest and differentiation of promyelocytic leukemia cells. *Cell* **59**, 959-968.
32. Borregaard, N., Cowland, J. (1997). Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* **89**, 3503-3521.
33. Boudier, C., Holle, C., Bieth, J. G. (1981). Stimulation of the elastolytic activity of leukocyte elastase by leukocyte cathepsin G. *J. Biol. Chem.* **256**, 10256-10258.

34. Boudier, C., Laurent, P., Bieth, J. G. (1984). Leukoproteinases and pulmonary emphysema: cathepsin G and other chymotrypsin-like proteinases enhance the elastolytic activity of elastase on lung elastin. *Adv. Exp. Med. Biol.* **167**, 313-317.
35. Boyum, A. (1974). Separation of blood leukocytes, granulocytes and lymphocytes. *Tissue Antigens* **4**, 269-274.
36. Brandt De, M., Ollivier, V., Meyer, O., Babin Chevaye, C., Khechai, F., de Prost, D., Hakim, J., Pasquier, C. (1997). Induction of interleukin-1 and subsequent tissue factor expression by anti-proteinase 3 antibodies in human umbilical vein endothelial cells. *Arthritis Rheum.* **40**, 2030-2038.
37. Bray, K. R., Gershwin, M. E., Skelly, R. R., Ahmed, A., Kincade, P. W. (1984). Studies of congenitally immunologically mutant New Zealand mice. IX. Age-related microenvironmental effects on autoantibody production in NZB and NZB.X^{id} mice studied by transplantation. *J. Immunol.* **132**, 2913-2918.
38. Breit, S. A., Wakefield, D., Robinson, J. P., Luckhurst, E., Clark, P., Penny, P. (1985). The role of α 1-antitrypsin deficiency in the pathogenesis of immune disorders. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **35**, 363-380.
39. Bronstein, I., Voyta, J. C., Murphy, O. J., Bresnick, L., Kricka, L. J. (1992). Improved chemiluminescent Western Blotting procedure. *BioTechniques* **12**, 748-753.
40. Brooks, C. J., King, W. J., Radford, D. J., Adu, D., McGrath, M., Savage, C. O. S. (1996). IL-1 beta production by human polymorphonuclear leukocytes stimulated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies: relevance to systemic vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* **106**, 273-279.
41. Brouwer, E., Huitema, M. G., Klok, P. A., de Weerd, H., Tervaert, J. W., Weening, J. J., Kallenberg, C. G (1993). Antimyeloperoxidase-associated proliferative glomerulonephritis: an animal model. *J. Exp. Med.* **177**, 905-914.
42. Brouwer, E., Klok, P. A., Huitema, M. G., Weening, J. J., Kallenberg, C. G (1995). Renal ischemia/reperfusion injury contributes to renal damage in experimental anti-myeloperoxidase-associated proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int.* **47**, 1121-1129.
43. Brouwer, E., Huitema, M. G., Mulder, A. H., Heeringa, P., van Goor, H., Tervaert, J. W. C., Weening, J. J., Kallenberg, C. G. M. (1994). Neutrophil activation *in vitro* and *in vivo* in Wegener's granulomatosis. *Kidney Int.* **45**, 1120-1131.
44. Brubaker, M. J., Groutas, W. C., Hoidal, J. R., Rao, N. V. (1992). Human neutrophil proteinase 3: mapping of the substrate binding site using peptidyl thiobenzyl esters. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **188**, 1318-1324.
45. Bucurenci, N., Blake, D. R., Chidwick, K., Winyard, P. G. (1992). Inhibition of neutrophil superoxide production by human plasma α 1-antitrypsin. *FEBS lett.* **300**, 21-24.
46. Cai, T.-Q., Wright, S. D. (1996). Human leukocyte elastase is an endogenous ligand for the integrin CR3 (CD11b/CD18, Mac-1, α _M β ₂) and modulates polymorphonuclear leukocyte adhesion. *J. Exp. Med.* **184**, 1213-1223.
47. Campanelli, D., Melchior, M., Fu, Y., Nakata, M., Shuman, H., Nathan, C., Gabay, J. E. (1990). Cloning of cDNA for proteinase 3: a serine protease, antibiotic, and autoantigen from human neutrophils. *J. Exp. Med.* **172**, 1709-1715.
48. Campanelli, D., Detmers, P. A., Nathan, C. F., Gabay, J. E. (1990). Azurocidin and a homologous serine protease from neutrophils. Differential antimicrobial and proteolytic properties. *J. Clin. Invest.* **85**, 904-915.
49. Campbell, E. J., Campbell, M. A., Owen, C. A. (2000). Bioactive proteinase 3 on the cell surface of human neutrophils: Quantification, catalytic activity, and susceptibility to inhibition. *J. Immunol.* **165**, 3366-3374.
50. Carp, H., Miller, F., Hoidal, J. R., Janoff, A. (1982). Potential mechanism of emphysema: alpha 1-proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase inhibitory capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 2041-2045.

51. Carruthers, D. M., Watts, R. A., Symmons, D. P., Scott, D. G. (1996). Wegener's granulomatosis-increased incidence or increased recognition? *Br. J. Rheumatol.* **35**, 142-145.
52. Cavarra, E., Martorana, P. A., Cortese, S., Gambelli, F., di Simplicio, P., Lungarella, G. (1997). Neutrophils in beige mice secrete normal amounts of cathepsin G and a 46 kDa latent form of elastase that can be activated extracellularly by proteolytic activity. *Biol. Chem.* **378**, 417-423.
53. Cepinskas, G., Sandig, M., Kvietys, P. R. (1999). PAF-induced elastase-dependent neutrophil transendothelial migration is associated with the mobilization of elastase to the neutrophil surface and localization to the migrating front. *J. Cell Sci.* **112**, 1937-1945.
54. Champagne, B., Tremblay, P., Cantin, A., St. Pierre, Y. (1998). Proteolytic cleavage of ICAM-1 by human neutrophil elastase. *J. Immunol.* **161**, 6398-6405.
55. Chang, A. C., Cohen, S. N. (1978). Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**, 1141-1156.
56. Chothia, C. (1976). The nature of the accessible and buried surfaces in proteins. *J. Mol. Biol.* **105**, 1-14.
57. Chou, Q., Russell, M., Birch, D. E., Raymond, J., Bloch, W. (1992). Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucl. Acids Res.* **20**, 1717-1723.
58. Coeshott, C., Ohnemus, C., Pilyavskaya, A., Ross, S., Wieczorek, M., Kroona, H., Leimer, A. H., Cheronis, J. (1999). Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor α and IL-1 β from stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6261-6266.
59. Cohen Tervaert, J. W., Mulder, L., Stegeman, C., Elema, J., Huitema, M., The, H., Kallenberg, C. (1993). Occurrence of autoantibodies to human leukocyte elastase in Wegener's granulomatosis and other inflammatory disorders. *Ann. Rheum. Dis.* **52**, 115-120.
60. Collins, P. D., Jose, P. J., Williams, T. J. (1991). The sequential generation of neutrophil chemoattractant proteins in acute inflammation in the rabbit in vivo. Relationships between C5a and proteins with the characteristics of IL-8/neutrophil activating protein. *J. Immunol.* **146**, 677-684.
61. Coremans, I. E. M., Hagen, E. C., Daha, M. R., van der Woude, F. J., van der Voort, E. A. M., Kleijburg-van der Keur, C., Breedveld, F. C. (1992). Antilactoferrin antibodies in patients with rheumatoid arthritis are associated with vasculitis. *Arthritis Rheum.* **35**, 1466-1475.
62. Cosloy, S.D., Oishi, M. (1973). Genetic transformation in *Escherichia coli* K12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 8630-8634.
63. Cotch, M. F., Hoffman, G. S., Yerg, D. E., Kaufman, G. I., Targonski, P., Kaslow, R. A. (1996). The epidemiology of Wegener's granulomatosis. Estimates of a five-year period prevalence, annual mortality, and geographic disease distribution from population-based sources. *Arthritis Rheum.* **39**, 87-92.
64. Csernok, E., Ernst, M., Schmitt, W., Bainton, D. F., Gross, W. L. (1994). Activated neutrophils express proteinase 3 on their plasma membrane *in vitro* and *in vivo*. *Clin. Exp. Immunol.* **95**, 244-250.
65. Csernok, E., Lüdemann, J., Gross, W. L., Bainton, D. F. (1990). Ultrastructural localization of proteinase 3, the target antigen of anti-cytoplasmic antibodies circulating in Wegener's granulomatosis. *Am. J. Pathol.* **137**, 1113-1120.
66. Csernok, E., Szymkowiak, C. H., Mistry, N., Daha, M. R., Gross, W. L., Kekow, J. (1996). Transforming growth factor-beta (TGF-beta) expression and interaction with proteinase 3 (PR3) in anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* **105**, 104-111.

67. Csernok, E., Trabandt, A., Müller, A., Wang, G. C., Moosig, F., Paulsen, J., Schnabel, A., Gross, W. L. (1999). Cytokine profiles in Wegener's granulomatosis. Predominance of type 1 (Th1) in the granulomatous inflammation. *Arthritis Rheum.* **42**, 742-750.
68. Czerkinsky, C. C., Nilsson, L. A., Nygren, H., Ouchterlony, O., Tarkowski, A. (1983). A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J. Immunol. Methods* **65**, 109-121.
69. Dagert, M., Ehrlich, S. D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**, 23-28.
70. Damianovich, M., Gilburd, B., George, J., Del Papa, N., Afek, A., Goldberg, I., Kopolovic, Y., Roth, D., Barkai, G., Meroni, P.-L., Shoenfeld, Y. (1996). Pathogenic role of anti-endothelial cell antibodies in vasculitis. An idiotypic experimental model. *J. Immunol.* **156**, 4946-4951.
71. Danchin, A., Henaut, A. (1997). The map of the cell is in the chromosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**, 852-854.
72. Dang, Q. D., Sabetta, M., Di Cera, E. (1997). Selective loss of fibrinogen clotting in a loop-less thrombin. *J. Biol. Chem.* **272**, 19649-19651.
73. Daouk, G. H., Palsson, R., Arnaout, M. A. (1995). Inhibition of proteinase 3 by ANCA and its correlation with disease activity in Wegener's granulomatosis. *Kidney Int.* **47**, 1528-1536.
74. Daout, M. S., Gibson, L. E., DeRemee, R. A., Specks, U., el-Azhary, R. A., Daniel Su, W. P. (1994). Cutaneous Wegener's granulomatosis: clinical, histopathologic, and immunopathologic features of thirty patients. *J. Am. Acad. Dermatol.* **31**, 605-612.
75. Davies, D. J., Moran, J. E., Niall, J. F., Ryan, G. B. (1982). Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology. *Br. Med. J.* **285**, 606.
76. Dawe, C. J., Freund, R., Barncastle, J. P., Dubensky, T. W., Mandel, G., Benjamin, T. L. (1987). Necrotizing arterial lesions in mice-bearing tumors induced by polyoma virus. *J. Exp. Pathol.* **3**, 177-201.
77. Del Papa, N., Guidali, L., Sironi, M., Shoenfeld, Y., Mantovani, A., Tincani, A., Balestrieri, G., Radice, A., Sinico, R. A., Meroni, P. L. (1996). Anti-endothelial cell IgG antibodies from patients with Wegener's granulomatosis bind to human endothelial cells in vitro and induce adhesion molecule expression and cytokine secretion. *Arthritis Rheum.* **39**, 758-766.
78. Devi, S., Laning, J., Luo, Y., Dorf, M. E. (1995). Biologic activities of the beta-chemokine TCA3 on neutrophils and macrophages. *J. Immunol.* **154**, 5376-5383.
79. Dikov, M. M., Springman, E. B., Yeola, S., Serafin, W. E. (1994). Processing of Procarboxypeptidase A and other zymogens in murine mast cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 25897-25904.
80. DiMartino, S. J., Kew, R. R. (1999). Initial characterization of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) binding site on the neutrophil plasma membrane: evidence for a chondroitin sulfate proteoglycan. *J. Immunol.* **163**, 2135-2142.
81. DiMartino, S. J., Shah, A. B., Trujillo, G., Kew, R. R. (2001). Elastase controls the binding of the vitamin D-binding protein (Gc-globulin) to neutrophils: a potential role in the regulation of C5a co-chemotactic activity. *J. Immunol.* **166**, 2688-2694.
82. Dixon, F. J., Vazquez, J. J., Wiegler, W. O., Cochrane, C. G. (1958). Pathogenesis of serum sickness. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **65**, 18-25.
83. Dolman, K. M., Stegeman, C. A., van de Wiel, B. A., Hack, C. E., von dem Borne, A. E. G., Kallenberg, C. G. M., Goldschmeding, R. (1993). Relevance of classic anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody (C-ANCA)-mediated

- inhibition of proteinase 3-alpha 1-antitrypsin complexation to disease activity in Wegener's granulomatosis. *Clin. Exp. Immunol.* **93**, 405-410.
84. Dower, W. J., Miller, J. F., Rafsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* **16**, 6127-6145.
85. Edman, P., Begg, G. (1967). A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.* **1**, 80-91.
86. Eeden van, S. F., Klut, M. E., Walker, B. A. M., Hogg, J. C. (1999). The use of flow cytometry to measure neutrophil function. *J. Immunol. Methods* **232**, 23-43.
87. Elzouki, A.-N., Segelmark, M., Wieslander, J., Eriksson, S. (1994). Strong link between the alpha-1-antitrypsin PiZ allele and Wegener's granulomatosis. *J. Intern. Med.* **236**, 543-548.
88. Ember, J. A., Jagels, M. A., Hugli, T. E. (1998). Characterization of complement anaphylatoxins and their biological responses. In Volonakis, J. E., Frank, M. M. (Hrsg.), *The Human complement system in health and disease*. Marcel Dekker Inc., New York.
89. Emmendorfer, A., Hecht, M., Lohmann-Matthes, M.-L., Roesler, J. (1990). A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123. *J. Immunol. Methods* **131**, 269-275.
90. English, D., Andersen B.R. (1974). Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradient of ficoll-hypaque. *J. Immunol. Methods* **5**, 249.
91. Engvall, E., Perlman, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**, 871-879.
92. Ermolieff, J., Boudier, C., Laine, A., Meyer, B., Bieth, J. G. (1994). Heparin protects cathepsin G against inhibition by protein proteinase inhibitors. *J. Biol. Chem.* **269**, 29502-29508.
93. Esnault, V. L., Testa, A., Audrain, M., Roge, C., Hamidou, M., Barrier, J. H., Sesboue, R., Martin, J. P., Lesavre, P. (1993). Alpha1-antitrypsin genetic polymorphism in ANCA-positive systemic vasculitis. *Kidney Int.* **43**, 1329-1332.
94. Falk, R. J., Hogan, S., Carey, T. S., Jennette, J. C. (1990). The clinical course of patients with antineutrophil cytoplasmic autoantibody associated glomerulonephritis and systemic vasculitis. The glomerular disease collaborative network. *Ann. Intern. Med.* **113**, 656-663.
95. Falk, R. J., Jennette, J. C. (1988). Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N. Engl. J. Med.* **25**, 1651-1657.
96. Falk, R. J., Terrell, R. S., Charles, L. A., Jennette, J. C. (1990). Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4115-4119.
97. Faller, B., Frommherz, K., Bieth, J. G. (1992). Heparin interferes with the inhibition of neutrophil elastase by its physiologic inhibitors. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **373**, 503-508.
98. Fantuzzi, G., Dinarello, C. A. (1999). Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *J. Clin. Immunol.* **19**, 1-11.
99. Fauci, A. S., Haynes, B. G., Katz, P., Wolff, S. M. (1983). Wegener's granulomatosis: prospective clinical and therapeutic experience with 85 patients for 21 years. *Ann. Intern. Med.* **98**, 76-85.
100. Fazekas de, S., Groth, S., Webster, R. G., Datyner, A. (1963). Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim. Biophys. Acta* **71**.

-
101. Ferry, G., Lonchamp, M., Pennel, L., de Nanteuil, G., Canet, E., Tucker, G. C. (1997). Activation of MMP-9 by neutrophil elastase in an *in vivo* model of acute lung injury. *FEBS Lett.* **402**, 111-115.
102. Fletcher, D. S., Osinga, D., Bonney, R. J. (1986). Role of polymorphonuclear leukocytes in connective tissue breakdown during the reverse passive Arthus reaction. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 2601-2606.
103. Foreman, K. E., Glovsky, M. M., Warner, R. L., Horvath, S. J., Ward, P. A. (1996). Comparative effect of C3a and C5a on adhesion molecule expression on neutrophils and endothelial cells. *Inflammation* **20**, 1-9.
104. Franzoso, G., Biswas, P., Poli, G., Carlson, L. M., Brown, K. D., Tomita Yamaguchi, M., Fauci, A. S., Siebenlist, U. K. (1994). A family of serine proteases expressed exclusively in myelo- and monocytic cells specifically processes the nuclear factor-kappa B subunit p65 *in vitro* and may impair human immunodeficiency virus replication in these cells. *J. Exp. Med.* **180**, 1445-1456.
105. Fröhlich, L. O. (1999). Proteinase-3/Elastase-2-defiziente Mäuse als Modell zur funktionellen Charakterisierung der beiden inflammatorischen Serinproteasen aus neutrophilen Granulozyten. Dissertation Universität Salzburg.
106. Früh, H., Kostoulas, G., Michel, B. A., Baici, A. (1996). Human myeloblastin (leukocyte proteinase 3): Reactions with substrates, inactivators and activators in comparison with leukocyte elastase. *Biol. Chem.* **377**, 579-586.
107. Fujinaga, M., Cherniaia, M. M., Halenbeck, R., Kothe, K., James, M. N. G. (1996). The crystal structure of PR3, a neutrophil serine proteinase antigen of Wegener's granulomatosis antibodies. *J. Mol. Biol.* **261**, 267-278.
108. Gabay, J. E., Scott, R. W., Campanelli, D., Griffith, J., Wilde, C., Marra, M. N., Seeger, M., Nathan, C. F. (1989). Antibiotic proteins of human polymorphonuclear leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5610-5614.
109. Gallagher, J. T., Lyon, M., Steward, W. P. (1986). Structure and function of heparan sulphate proteoglycans. *Biochem. J.* **236**, 313-325.
110. Gamble, J. R., Harlan, J. M., Klebanoff, S. J., Vadas, M. A. (1985). Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 8667-8671.
111. Gardi, C., Cavarra, E., Calzoni, P., Marcolongo, P., de Santi, M., Martorana, P. A., Lungarella, G. (1994). Neutrophil lysosomal dysfunctions in mutant C57 BL/6J mice: interstrain variations in content of lysosomal elastase, cathepsin G and their inhibitors. *Biochem. J.* **299**, 237-245.
112. Garwicz, D., Lindmark, A., Hellmark, T., Gladh, M., Jögi, J., Gullberg, U. (1997). Characterization of the processing and granular targeting of human proteinase 3 after transfection to the rat RBL or the murine 32D leukemic cell lines. *J. Leukoc. Biol.* **61**, 113-123.
113. Geld van der, Y. M., Huitema, M. G., Franssen, C. F. M., van der Zee, R., Limburg, P. C., Kallenberg, C. G. M. (2000). *In vitro* T lymphocyte responses to proteinase 3 (PR3) and linear peptides of PR3 in patients with Wegener's granulomatosis (WG). *Clin. Exp. Immunol.* **122**, 504-513.
114. Geld van der, Y. M., Oost-Kort, W., Limburg, P. C., Specks, U., Kallenberg, C. G. M. (2000). Recombinant proteinase 3 produced in different expression systems: recognition by anti-PR3 antibodies. *J. Immunol. Methods* **244**, 117-131.
115. Geld van der, Y. M., Simpelaar, A., Zee van der, R., Tervaert, J. W. C., Stegeman, C. A., Limburg, P. C., Kallenberg, C. G. M. (2001). Antineutrophil cytoplasmic antibodies to proteinase 3 in Wegener's granulomatosis: epitope analysis using synthetic peptides. *Kidney Int.* **59**, 147-159.
116. Gencik, M., Meller, S., Borgmann, S., Fricke, H. (2000). *Proteinase 3* gene polymorphisms and Wegener's granulomatosis. *Kidney Int.* **58**, 2473-2477.
117. Geysen, H. M., Tainer, J. A., Rodda, S. J., Mason, T. J., Alexander, H., Getzoff, E. D., Lerner, R. A. (1987). Chemistry of antibody binding to a protein. *Science* **235**, 1184-1190.

-
118. Gilligan, H. M., Bredy, B., Brady, H. R., Hebert, M. J., Slayter, H. S., Xu, Y., Rauch, J., Shia, M. A., Koh, J. S., Levine, J. S. (1996). Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies interact with primary granule constituents on the surface of apoptotic neutrophils in the absence of neutrophil priming. *J. Exp. Med.* **184**, 2231-2241.
119. Giscombe, R., Nityanand, S., Lewin, N., Grunewald, J., Lefvert, A. K. (1998). Expanded T cell populations in patients with Wegener's granulomatosis: characteristics and correlates with disease activity. *J. Clin. Immunol.* **18**, 404-413.
120. Godman, G. C., Churg, J. (1954). Wegener's granulomatosis. *Arch. Pathol.* **58**, 533-553.
121. Goldstein, I. M. (1988). Complement: biologically active products. In *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*. Gallin, J. I., Goldstein, I. M., Snyderman, R. (Hrsg.). Raven Press, New York.
122. Griffith, M. E., Coulthart, A., Pemberton, S., George, A. J. T., Pusey, C. D. (2001). Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) from patients with systemic vasculitis recognize restricted epitopes of proteinase 3 involving the catalytic site. *Clin. Exp. Immunol.* **123**, 170-177.
123. Griffith, M. E., Coulthart, A., Pemberton, S., Pusey, C. D. (1996). C-ANCA recognise a restricted number of linear epitopes of proteinase 3 which involve the catalytic site. *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis.* **13**, 256.
124. Grimminger, F., Hattar, K., Papavassilis, C., Temmesfeld, B., Csernok, E., Gross, W. L., Seeger, W., Sibelius, U. (1996). Neutrophil activation by anti-proteinase 3 antibodies in Wegener's granulomatosis: Role of exogenous arachidonic acid and leukotriene B-4 generation. *J. Exp. Med.* **184**, 1567-1572.
125. Gross, W. L. (1991). Wegener-Granulomatose. In *Klinische Immunologie*, Peter, H. H. (Hrsg.) S. 392-400. Urban und Schwarzenberg, München.
126. Gross, W. L., Csernok, E., Flesch, B. K. (1993). 'Classic' anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (cANCA), 'Wegener's Autoantigen' and their immunopathogenic role in Wegener's Granulomatosis. *J. Autoimmunity* **6**, 171-184.
127. Gross, W. L., Csernok, E., Helmchen, U. (1995). Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies, autoantigens, and systemic vasculitis. *APMIS* **103**, 81-97.
128. Gross, W. L., Lüdemann, G., Kiefer, G., Lehmann, H. (1986). Anticytoplasmic antibodies in Wegener's granulomatosis. *Lancet* **1**, 806-807.
129. Guex, N., Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723.
130. Gullberg, U., Andersson, E., Garwicz, D., Lindmark, A., Olsson, I. (1997). Biosynthesis, processing and sorting of neutrophil proteins: insight into neutrophil granule development. *Eur. J. Haematol.* **58**, 137-153.
131. Gullberg, U., Lindmark, A., Lindgren, G., Persson, A. M., Nilsson, E., Olsson, I. (1995). Carboxyl-terminal prodomain deleted human leukocyte elastase and Cathepsin G are efficiently targeted to granules and enzymatically activated in the rat basophilic/mast cell line RBL. *J. Biol. Chem.* **270**, 12912-12918.
132. Gupta, S. K., Niles, J. L., McCluskey, R. T., Arnaout, M. A. (1990). Identity of Wegener's autoantigen (p29) with proteinase 3 and myeloblastin. *Blood* **76**, 2162-2166.
133. Hagen, E. C., Andrassy, K., Csernok, E., Daha, M. R., Gaskin, G., Gross, W. L., Hansen, B., Heigl, Z., Hermans, J., Jayne, D., Kallenberg, C. G., Lesavre, P., Lockwood, C. M., Lüdemann, J., Mascart-Lemone, F., Mirapeix, E., Pusey, C. D., Rasmussen, N., Sinico, R. A., Tzioufas, A., Wieslander, J., Wiik, A., van der Woude, F. J. (1996). Development and standardization of solid phase assays for the detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA); A report on the second phase of an international cooperative study on the standardization of ANCA assays. *J. Immunol. Methods* **196**, 1-15.

-
134. Halbwachs-Mecarelli, L., Nusbaum, P., Nothmann, L. H., Remaux, D., Erlinger, S. (1992). Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against Cathepsin G in ulcerative colitis, Crohn's disease and primary sclerosing cholangitis. *Clin. Exp. Immunol.* **90**, 79-84.
135. Haller, H., Eichhorn, J., Pieper, K., Gobel, U., Luft, F. C. (1996). Circulating leukocyte integrin expression in Wegener's granulomatosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **7**, 40-48.
136. Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
137. Hardingham, T. E., Fosang, A. J. (1992). Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.* **6**, 861-870.
138. Harmsen, M.C., Heeringa, P., van der Geld, Y. M., Huitema, M. G., Klimp, A., Tiran, A., Kallenberg, C. G. M. (1997). Recombinant proteinase 3 (Wegener's antigen) expressed in *Pichia pastoris* is functionally active and is recognized by patient sera. *Clin. Exp. Immunol.* **110**, 257-264.
139. Hattar, K., Sibelius, U., Bickenbach, A., Csernok, E., Seeger, W., Grimminger, F. (2001). Subthreshold concentrations of anti-proteinase 3 antibodies (c-ANCA) specifically prime human neutrophils for fMLP-induced leukotriene synthesis and chemotaxis. *J. Leukoc. Biol.* **69**, 89-97.
140. Hauschild, S., Schmitt, W. H., Csernok, E., Flesch, B. K., Rautmann, A., Gross, W. L. (1993). ANCA in systemic vasculitides, collagen vascular diseases, rheumatic disorders and inflammatory bowel diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* **336**, 245-251.
141. Heeringa, P., Foucher, P., Klok, P. A., Huitema, M. G., Cohen Tervaert, J. W., Weening, J. J., Kallenberg, C. G. (1997). Systemic injection of products of activated neutrophils and H₂O₂ in myeloperoxidase-immunized rats leads to necrotizing vasculitis in the lungs and gut. *Am. J. Pathol.* **151**, 131-140.
142. Heller, T., Gessner, J. E., Schmidt, R. E., Klos, A., Bautsch, W., Köhl, J. (1999). F_c receptor type I for IgG on macrophages and complement mediate the inflammatory response in immune complex peritonitis. *J. Immunol.* **162**, 5657-5661.
143. Helsloot, J., Virgo, S., McGuigan, L., Sturgess, A. (1995). Antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory arthritis-potential for misdiagnosis. *Br. J. Rheumatol.* **34**, 820-824.
144. Henshaw, T. J., Malone, C. C., Gabay, J. E., Williams, R. C. (1994). Elevations of neutrophil proteinase 3 in serum of patients with Wegener's granulomatosis and polyarteritis nodosa. *Arthritis Rheum.* **37**, 104-112.
145. Hicks, J. D. (1966). Vascular changes in the kidneys of NZB mice and F1 NZBxNZW hybrids. *J. Pathol. Bacteriol.* **91**, 479-486.
146. Höpken, U. E., Lu, B., Gerard, N. P., Gerard, C. (1997). Impaired inflammatory responses in the reverse Arthus reaction through genetic depletion of the C5a receptor. *J. Exp. Med.* **185**, 749-756.
147. Hoffman, G. S., Kerr, G. S., Leavitt, R. Y., Hallahan, C. W., Lebovics, R. S., Travis, W. D., Rottem, M., Fauci, A. S. (1992). Wegener granulomatosis: an analysis of 158 patients. *Ann. Intern. Med.* **116**, 488-498.
148. Hoffman, G. S., Specks, U. (1998). Antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Arthritis Rheum.* **41**, 1521-1537.
149. Horwitz, M., Benson, K. F., Person, R. E., Aprikyan, A. G., Dale, D. C. (1999). Mutations in *ELA2*, encoding neutrophil elastase, define a 21-day biological clock in cyclic haematopoiesis. *Nature Genet.* **23**, 433-436.
150. Humphrey, J. H. (1955). The mechanisms of Arthus reactions: II. The role of polymorphonuclear leukocytes and other factors in reversed passive Arthus reactions in rabbits. *Br. J. Exp. Pathol.* **36**, 268-282.
151. Jayne, D. R., Weetman, A. P., Lockwood, C. M. (1991). IgG subclass distribution of autoantibodies to neutrophil cytoplasmic antigens in systemic vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* **84**, 476-481.

-
152. Jenne, D. E. (1994). Structure of the azurocidin, proteinase 3, and neutrophil elastase genes. Implications for inflammation and vasculitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **150**, 147-154.
153. Jenne, D. E., Fröhlich, L., Hummel, A. M., Specks, U. (1997). Cloning and functional expression of the murine homologue of proteinase 3: implications for the design of murine models of vasculitis. *FEBS lett.* **408**, 187-190.
154. Jenne, D. E., Tschopp, J., Lüdemann, J., Utecht, B., Gross, W. L. (1990). Wegener's autoantigen decoded. *Nature* **346**, 520.
155. Jennette, J. C., Falk, R. J., Andrassy, K., Bacon, P. A., Churg, J., Gross, W. L., Hagen, E. C., Hoffman, G. S., Hunder, G. G., Kallenberg, C. G. M., McCluskey, R. T., Sinico, R. A., Rees, A. J., Vanes, L. A., Waldherr, R., Wiik, A. (1994). Nomenclature of systemic vasculitides-proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum.* **37**, 187-192.
156. Jennette, J. C., Hoidal, J. R., Falk, R. J. (1990). Specificity of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies for proteinase 3. *Blood* **75**, 2263-2264.
157. Jennings, J. G., Chang, L., Savige, J. A. (1994). Anti-proteinase 3 antibodies, their characterization and disease associations. *Clin. Exp. Immunol.* **95**, 251-256.
158. Jin, F. Y., Nathan, C., Radzioch, D., Ding, A. (1997). Secretory leukocyte protease inhibitor: a macrophage product induced by and antagonistic to bacterial lipopolysaccharide. *Cell* **88**, 417-426.
159. Johnson, P. A., Alexander, H. D., McMillan, S. A., Maxwell, A. P. (1997). Up-regulation of the endothelial cell adhesion molecule intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) by autoantibodies in autoimmune vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* **108**, 234-242.
160. Johnson, R. J., Couser, W. G., Alpers, C. E., Vissers, M., Schulze, M., Klebanoff, S. J. (1988). The human neutrophil serine proteinases Elastase and Cathepsin G, can mediate glomerular injury in vivo. *J. Exp. Med.* **168**, 1169-1174.
161. Johnson, A. R., Hugli, T. E., Müller-Eberhard, H. J. (1975). Release of histamine from rat mast cells by complement peptides C3a and C5a. *Immunology* **28**, 1067-1080.
162. Jones, R., Kirton, O. C., Zapol, W. M., Reid, L. (1986). Rat pulmonary artery wall injury by chronic intermittent infusions of *Escherichia coli* endotoxin. Obliterative vasculitis and vascular occlusion. *Lab. Invest.* **54**, 282-294.
163. Joslin, G., Griffin, G. L., August, A. M., Adams, S., Fallon, R. J., Senior, R. M., Perlmutter, D. H. (1992). The serpin-enzyme complex (SEC) receptor mediates the neutrophil chemotactic effect of alpha-1 antitrypsin-elastase complexes and amyloid-beta peptide. *J. Clin. Invest.* **90**, 1150-1154.
164. Kallenberg, C. G. M., Brouwer, E., Weening, J. J., Cohen Tervaert, J. W. (1994). Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: current diagnostic and pathophysiological potential. *Kidney Int.* **46**, 1-15.
165. Kallenberg, C. G. M., Mulder, A. H., Cohen Tervaert, J. W. (1992). Antineutrophil cytoplasmic antibodies: a still growing class of autoantibodies in inflammatory disorders. *Am. J. Med.* **93**, 675-682.
166. Kam, C.-M., Kerrigan, J. E., Dolman, K. M., Goldschmeding, R., von dem Borne, A. E. G. K., Powers, J. C. (1992). Substrate and inhibitor studies on proteinase 3. *FEBS lett.* **297**, 119-123.
167. Kane, J. F. (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotech.* **6**, 494-500.
168. Kao, R. C., Wehner, N. G., Skubitz, K. M., Gray, B. H., Hoidal, J. R. (1988). Proteinase 3. A distinct human polymorphonuclear leukocyte proteinase that produces emphysema in hamsters. *J. Clin. Invest.* **82**, 1963-1973.

169. Kekow, J., Szymkowiak, C. H., Gross, W. L. (1992). Involvement of cytokines in granuloma formation within primary systemic vasculitis. In *Cytokines: basic principles and clinical applications*, Romagnani, S. (Hrsg.). S. 341-348. Raven Press, New York.
170. Keogan, M. T., Esnault, V. L., Green, A. J., Lockwood, C. M., Brown, D. L. (1992). Activation of normal neutrophils by anti-neutrophil cytoplasm antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* **90**, 228-234.
171. Kindler, V., Sappino, A.-P., Grau, G. E., Piguet, P.-F., Vassalli, P. (1989). The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* **56**, 731-740.
172. King, W. J., Adu, D., Daha, M. R., Brooks, C. J., Radford, D. J., Pall, A. A., Savage, C. O. S. (1995). Endothelial cells and renal epithelial cells do not express the Wegener's autoantigen, proteinase 3. *Clin. Exp. Immunol.* **102**, 98-105.
173. Kirschfink, M., Borsos, T. (1988). Binding and activation of C4 and C3 on the red cell surface by non-complement enzymes. *Mol. Immunol.* **25**, 505-512.
174. Kjellén, L., Lindahl, U. (1991). Proteoglycans: structures and interactions. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 443-475.
175. Klinger, H. (1931). Grenzformen der Panarteriitis nodosa. *Frankf. Z. Path.* **42**, 455-480.
176. Klinman, D. M., Steinberg, A. D. (1986). Proliferation of anti-DNA-producing NZB B cells in a non-autoimmune environment. *J. Immunol.* **137**, 69-75.
177. Kocher, M., Edberg, J. C., Fleit, H. B., Kimberly, R. P. (1998). Antineutrophil cytoplasmic antibodies preferentially engage FcγRIIIb on human neutrophils. *J. Immunol.* **161**, 6909-6914.
178. Kondo, S., Sauder, D. N. (1997). Tumor necrosis factor (TNF) receptor type 1 (p55) is a main mediator for TNFα-induced skin inflammation. *Eur. J. Immunol.* **27**, 1713-1718.
179. Kostoulas, G., Hörlner, D., Naggi, A., Casu, B., Baici, A. (1997). Electrostatic interactions between human leukocyte elastase and sulfated glycosaminoglycans: physiological implications. *Biol. Chem.* **378**, 1481-1489.
180. Kraut, J. (1977). Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Ann. Rev. Biochem.* **46**, 331-358.
181. Krieglner, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I., Lu, S. D. (1988). A novel form of TNF/Cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* **53**, 45-53.
182. Kummer, J. A., Kamp, A. M., Citarella, F., Horrevoets, A. J. G., Hack, C. E. (1996). Expression of human recombinant granzyme A zymogen and its activation by the cysteine proteinase cathepsin C. *J. Biol. Chem.* **271**, 9281-9286.
183. Kurosawa, S., Esmon, C. T., Stearns-Kurosawa, D. J. (2000). The soluble endothelial protein C receptor binds to activated neutrophils: involvement of proteinase-3 and CD11b/CD18. *J. Immunol.* **165**, 4697-4703.
184. Kusner, D. J., Aucott, J. N., Franceschi, D., Sarasua, M. M., Spagnuolo, P. J., King, C. H. (1991). Protease priming of neutrophil superoxide production. Effects on membrane lipid order and lateral mobility. *J. Biol. Chem.* **266**, 16465-16471.
185. Kusner, D. J., King, C. H. (1989). Protease-modulation of neutrophil superoxide response. *J. Immunol.* **143**, 1696-1702.
186. Labrouche, S., Freyburger, G., Belloc, F., Boisseau, M. R. (1992). Influence of selected heparins on human neutrophil function *in vitro*. *Thromb. Haemost.* **68**, 556-562.
187. Lagasse, E., Weissman, I. L. (1996). Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. *J. Immunol. Methods* **197**, 139-150.
188. Langford, C. A., Sneller, M. C. (1996). Finding a valid model for antineutrophil cytoplasmic antibody-related vasculitis: comment on the article by Tomer et al. *Arthritis Rheum.* **39**, 1262.

-
189. Layne, E. (1957). Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods Enzymol.* **3**, 447-454.
190. Le-Barillec, K., Si-Tahar, M., Balloy, V., Chignard, M. (1999). Proteolysis of monocyte CD14 by human leukocyte elastase inhibits lipopolysaccharide-mediated cell activation. *J. Clin. Invest.* **103**, 1039-1046.
191. Lee, N., Zhang, S.-Q., Cozzitorto, J., Yang, J.-S., Testa, D. (1987). Modification of mRNA secondary structure and alteration of the expression of human interferon $\alpha 1$ in *Escherichia coli*. *Gene* **58**, 77-86.
192. Leid, R. W., Ballieux, B. E., van der Heijden, I., Kleyburg van der Keur, C., Hagen, E. C., van Es, L. A., van der Woude, F. J., Daha, M. R. (1993). Cleavage and inactivation of human C1 inhibitor by the human leukocyte proteinase 3. *Eur. J. Immunol.* **23**, 2939-2944.
193. Lewinsohn, D. M., Bargatze, R. F., Butcher, E. C. (1987). Leukocyte-endothelial cell recognition: evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes and other leukocytes. *J. Immunol.* **138**, 4313-4321.
194. Lilie, H., Schwarz, E., Rudolph, R. (1998). Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr. Opin. Biotech.* **9**, 497-501.
195. Lomas, D. A., Stone, S. R., Llewellyn-Jones, C., Keogan, M.-T., Wang, Z.-M., Rubin, H., Carrell, R. W., Stockley, R. A. (1995). The control of neutrophil chemotaxis by inhibitors of cathepsin G and chymotrypsin. *J. Biol. Chem.* **270**, 23437-23443.
196. Ludviksson, B. R., Sneller, M. C., Chua, K. S., Talar-Williams, C., Langford, C. A., Ehrhardt, R. O., Fauci, A. S., Strober, W. (1998). Active Wegener's granulomatosis is associated with HLA-DR⁺ CD4⁺ T cells exhibiting an unbalanced Th1-type T cell cytokine pattern: reversal with IL-10. *J. Immunol.* **160**, 3602-3609.
197. Lutz, P. G., Moog-Lutz, C., Coumau-Gatbois, E., Kobari, L., Di Gioia, Y., Cayre, Y. E. (2000). Myeloblastin is a granulocyte colony-stimulating factor-responsive gene conferring factor-independent growth to hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1601-1606.
198. MacIvor, D. M., Shapiro, S. D., Pham, C. T. N., Belaouaj, A., Abraham, S. N., Ley, T. J. (1999). Normal neutrophil function in Cathepsin G-deficient mice. *Blood* **94**, 4282-4293.
199. Manz, R. A., Thiel, A., Radbruch, A. (1997). Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* **388**, 133-134.
200. Manz, R. A., Lohning, M., Cassese, G., Thiel, A., Radbruch, A. (1998). Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen. *Int. Immunol.* **10**, 1703-1711.
201. Marston, F. A. O. (1986). The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **240**, 1-12.
202. Mathur, A., Zhong, D., Sabharwal, A. K., Smith, K. J., Bajaj, S. P. (1997). Interaction of Factor IXa with Factor VIIIa; effects of protease domain Ca²⁺ binding site, proteolysis in the autolysis loop, phospholipid, and Factor X. *J. Biol. Chem.* **272**, 23418-23426.
203. Mayet, W. J., Csernok, E., Szymkowiak, C., Gross, W. L., Meyer zum Büschenfelde, K. H. (1993). Human endothelial cells express proteinase 3, the target antigen of anticytoplasmic antibodies in Wegener's granulomatosis. *Blood* **82**, 1221-1229.
204. Mayet, W. J., Meyer zum Büschenfelde, K. H. (1993). Antibodies to proteinase 3 increase adhesion of neutrophils to human endothelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* **94**, 440-446.
205. Mayet, W. J., Schwarting, A., Orth, T., Duchmann, R., Meyer zum Büschenfelde, K. H. (1996). Antibodies to proteinase 3 mediate expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *Clin. Exp. Immunol.* **103**, 259-267.

-
206. Mayo, L. A., Curnutte, J. T. (1990). Kinetic microplate assay for superoxide production by neutrophils and other phagocytic cells. *Methods Enzymol.* **186**, 567-575.
207. McGuire, M. J., Lipsky, P. E., Thiele, D. L. (1993). Generation of active myeloid and lymphoid granule serine proteases requires processing by the granule thiol protease Dipeptidyl Peptidase I. *J. Biol. Chem.* **268**, 2458-2467.
208. Merkel, P. A., Polisson, R. P., Chang, Y., Skates, S. J., Niles, J. L. (1997). Prevalence of antineutrophil cytoplasmic antibodies in a large inception cohort of patients with connective tissue disease. *Ann. Intern. Med.* **126**, 866-873.
209. Meyer, T. S., Lamberts, B. L. (1965). Use of Coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim. Biophys. Acta* **107**, 144-145.
210. Ming, W. J., Bersani, L., Mantovani, A. (1987). Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* **138**, 1469-1474.
211. Moins-Teisserenc, H. T., Gadola, S. D., Cella, M., Dunbar, P. R., Exley, A., Blake, N., Baycal, C., Lambert, J., Bigliardi, P., Willemsen, M., Jones, M., Buechner, S., Colonna, M., Gross, W. L., Cerundolo, V. (1999). Association of a syndrome resembling Wegener's granulomatosis with low surface expression of HLA class-I molecules. *Lancet* **354**, 1598-1603.
212. Molldrem, J. J., Clave, E., Jiang, Y. Z., Mavroudis, D., Raptis, A., Hensel, N., Agarwala, V., Barrett, A. J. (1997). Cytotoxic T lymphocytes specific for a nonpolymorphic proteinase 3 peptide preferentially inhibit chronic myeloid leukemia colony-forming units. *Blood* **90**, 2529-2534.
213. Moosig, F., Csernok, E., Kumanovics, G., Gross, W. L. (2000). Opsonization of apoptotic neutrophils by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) leads to enhanced uptake by macrophages and increased release of tumor necrosis factor- α (TNF- α). *Clin. Exp. Immunol.* **122**, 499-503.
214. Moss, M. L., Jin, S. L. C., Milla, M. E., Burkhart, W., Carter, H. L., Chen, W. J., Clay, W. C., Didsbury, J. R., Hassler, D., Hoffman, C. R., Kost, T. A., Lambert, M. H., Leesnitzer, M. A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahel, G., Rocque, W., Overton, L. K., Schoenen, F., Seaton, T., Su, J. L., Warner, J., Willard, D., Becherer, J. D. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumor-necrosis factor- α . *Nature* **385**, 733-736.
215. Movat, H. Z., Burrowes, C. E., Cybulsky, M. I., Dinarello, C. A. (1987). Acute inflammation and a Shwartzman-like reaction induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor. Synergistic action of the cytokines in the induction of inflammation and microvascular injury. *Am. J. Pathol.* **129**, 463-476.
216. Muller-Kobold, A. C., Mesander, G., Stegeman, C. A., Kallenberg, C. G. M., Tervaert, J. W. C. (1998). Are circulating neutrophils intravascularly activated in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitides? *Clin. Exp. Immunol.* **114**, 491-499.
217. Mulligan, M. S., Varani, J., Warren, J. S., Till, G. O., Smith, C. W., Anderson, D. C., Todd, R. F., Ward, P. A. (1992). Role of β_2 integrins of rat neutrophils in complement and oxygen radical-mediated acute inflammatory injury. *J. Immunol.* **148**, 1847-1857.
218. Murakami, M., Karnik, S. S., Husain, A. (1995). Human prochymase activation; a novel role for heparin in zymogen processing. *J. Biol. Chem.* **270**, 2218-2223.
219. Mycek, M. J. (1979). Cathepsins. *Methods Enzymol.* **19**, 285-315.
220. Nakajima, K., Powers, J. C., Ashe, B. M., Zimmerman, B. M. (1979). Mapping the extended substrate binding site of cathepsin G and human leukocyte elastase. Studies with peptide substrates related to the alpha 1-protease inhibitor reactive site. *J. Biol. Chem.* **254**, 4027-4032.

221. Nässberger, L., Jonsson, H., Sjöholm, A. G., Sturfelt, G. (1989). Circulating anti-elastase in systemic lupus erythematosus. *Lancet* **1**, 509.
222. Nathan, C., Sporn, M. (1991). Cytokines in context. *J. Cell Biol.* **113**, 981-986.
223. Nölle, B., Specks, U., Lüdemann, J., Rohrbach, M. S., DeRemee, R. A., Gross, W. L. (1989). Anticytoplasmic autoantibodies: their immunodiagnostic value in Wegener's granulomatosis. *Ann. Intern. Med.* **111**, 28-40.
224. Norman, K. E., Argenbright, L. W., Williams, T. J., Rossi, A. G. (1994). Role of adhesion glycoproteins CD18 and ICAM-1 in inflammatory reactions of rabbit skin. *Br. J. Pharmacol.* **111**, 117-122.
225. Noronha, I. L., Kruger, C., Andrassy, K., Ritz, E., Waldherr, R. (1993). In situ production of TNF-alpha, IL-1 beta and IL-2R in ANCA-positive glomerulonephritis. *Kidney Int.* **43**, 682-692.
226. Ohlsson, K., Olsson, I. (1973). The neutral proteases of human granulocytes. Isolation and partial characterization of two granulocyte collagenases. *Eur. J. Biochem.* **36**, 473-481.
227. Orr, F. W., Varani, J., Kreutzer, D. L., Senior, R. M., Ward, P. A. (1979). Digestion of the fifth component of complement by leukocyte enzymes. Sequential generation of chemotactic activities for leukocytes and for tumor cells. *Am. J. Pathol.* **94**, 75-84.
228. Owen, C. A., Campbell, M. A., Sannes, P. L., Boukedes, S. S., Campbell, E. J. (1995). Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases. *J. Cell Biol.* **131**, 775-789.
229. Padrines, M., Wolf, M., Walz, A., Baggiolini, M. (1994). Interleukin-8 processing by neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase-3. *FEBS lett.* **352**, 231-235.
230. Pendergraft, W. F., Yang, J. J., Tuttle, R., Segelmark, M., Jennette, J. C., Falk, R. J., Preston, G. A. (1998). Myeloperoxidase (MPO) and proteinase 3 (Pr3) are not expressed by endothelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* **112** (suppl. 1), 19.
231. Peppin, G. J., Weiss, S. J. (1986). Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4322-4326.
232. Pereira, H. A., Erdem, I., Pohl, J., Spitznagel, J. K. (1993). Synthetic bactericidal peptide based on CAP37: A 37-kDa human neutrophil granule-associated cationic antimicrobial protein chemotactic for monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 4733-4737.
233. Perretti, M., Ahluwalia, A., Harris, J. G., Goulding, N. J., Flower, R. J. (1993). Lipocortin-1 fragments inhibit neutrophil accumulation and neutrophil-dependent edema in the mouse. A qualitative comparison with an anti-CD11b monoclonal antibody. *J. Immunol.* **151**, 4306-4314.
234. Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**, 346-356.
235. Peterson, M. W., Stone, P., Shasby, D. M. (1987). Cationic neutrophil proteins increase transendothelial albumin movement. *J. Appl. Physiol.* **62**, 1521-1530.
236. Pham, C. T. N., Ley, T. J. (1999). Dipeptidyl Peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8627-8632.
237. Pinching, A. J., Rees, A. J., Pussell, B. A., Lockwood, C. M., Mitchinson, R. S., Peters, D. K. (1980). Relapses in Wegener's granulomatosis: the role of infection. *Br. Med. J.* **281**, 836-838.

238. Pohl, J., Pereira, H. A., Martin, N. M., Spitznagel, J. K. (1990). Amino acid sequence of CAP37, a human neutrophil granule-derived antibacterial and monocyte-specific chemotactic glycoprotein structurally similar to neutrophil elastase. *FEBS Lett.* **272**, 200-204.
239. Polikandritou Lambros, M., Sheu, E., Lin, J. S., Pereira, H. A. (1997). Interaction of a synthetic peptide based on the neutrophil-derived antimicrobial protein CAP37 with dipalmitoyl-phosphatidylcholine membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1329**, 285-290.
240. Porges, A. J., Redecha, P. B., Kimberly, W. T., Csernok, E., Gross, W. L., Kimberly, R. P. (1994). Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies engage and activate human neutrophils via FcγRIIa. *J. Immunol.* **153**, 1271-1277.
241. Porteu, F., Brockhaus, M., Wallach, D., Engelmann, H., Nathan, C. F. (1991). Human neutrophil elastase releases a ligand-binding fragment from the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor. Comparison with the proteolytic activity responsible for the shedding of TNF receptors from stimulated neutrophils. *J. Biol. Chem.* **266**, 18846-18853.
242. Qasim, F. J., Mathieson, P. W., Sendo, F., Thiru, S., Oliveira, D. B. (1996). Role of neutrophils in the pathogenesis of experimental vasculitis. *Am. J. Pathol.* **149**, 81-89.
243. Ralston, D. R., Marsh, C. B., Lowe, M. P., Wewers, M. D. (1997). Antineutrophil cytoplasmic antibodies induce monocyte IL-8 release. Role of surface proteinase-3, alpha1-antitrypsin, and Fcγ receptors. *J. Clin. Invest.* **100**, 1416-1424.
244. Ramos, B. F., Zhang, Y., Jakschik, B. A. (1994). Neutrophil elicitation in the reverse passive Arthus Reaction; Complement-dependent and -independent mast cell involvement. *J. Immunol.* **152**, 1380-1384.
245. Rao, N. V., Marshall, B. C., Gray, B. H., Hoidal, J. R. (1993). Interaction of secretory leukocyte protease inhibitor with proteinase-3. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **8**, 612-616.
246. Rao, N. V., Wehner, N. G., Marshall, B. C., Gray, W. R., Gray, B. H., Hoidal, J. R. (1991). Characterization of Proteinase-3 (PR-3), a neutrophil serine proteinase. Structural and functional properties. *J. Biol. Chem.* **266**, 9540-9548.
247. Rao, J. K., Weinberger, M., Oddone, E. Z., Allen, N. B., Landsman, P., Feussner, J. R. (1995). The role of antineutrophil cytoplasmic antibody (c-ANCA) testing in the diagnosis of Wegener granulomatosis. A literature review and meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* **123**, 925-932.
248. Rao, N. V., Rao, G. V., Marshall, B. C., Hoidal, J. R. (1996). Biosynthesis and processing of proteinase 3 in U937 cells. Processing pathways are distinct from those of Cathepsin G. *J. Biol. Chem.* **271**, 2972-2978.
249. Rao, J., Zhang, F., Donnelly, R. J., Spector, N. L., Studzinski, G. P. (1998). Truncation of Sp1 transcription factor by myeloblastin in undifferentiated HL60 cells. *J. Cell Physiol.* **175**, 121-128.
250. Rasmussen, N. C., Sjolín, C., Isaksson, B., Bygren, P., Wieslander, J. (1990). An ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). *J. Immunol. Methods* **127**, 139-145.
251. Redini, F., Tixier, J.-M., Petitou, M., Choay, J., Robert, L., Hornebeck, W. (1988). Inhibition of leukocyte elastase by heparin and its derivatives. *Biochem. J.* **252**, 515-519.
252. Reilly, C. F., Fukunaga, Y., Powers, J. C., Travis, J. (1984). Effect of neutrophil cathepsin G on elastin degradation by neutrophil elastase. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **365**, 1131-1135.
253. Remold-O'Donnell, E., Parent, D. (1995). Specific sensitivity of CD43 to neutrophil elastase. *Blood* **86**, 2395-2402.
254. Renesto, P., Halbwachs-Mecarelli, L., Nusbaum, P., Lesavre, P., Chignard, M. (1994). Proteinase 3. A neutrophil proteinase with activity on platelets. *J. Immunol.* **152**, 4612-4617.

255. Renesto, P., Si-Tahar, M., Moniatte, M., Balloy, V., van Dorsselaer, A., Pidard, D., Chignard, M. (1997). Specific inhibition of thrombin induced cell activation by the neutrophil proteinases elastase, cathepsin G, and proteinase 3: evidence for distinct cleavage sites within the aminoterminal domain of the thrombin receptor. *Blood* **89**, 1944-1953.
256. Reumaux, D., Vossebeld, P. J., Roos, D., Verhoeven, A. J. (1995). Effect of tumor necrosis factor-induced integrin activation on Fc γ receptor II-mediated signal transduction: relevance for activation of neutrophils by anti-proteinase 3 or anti-myeloperoxidase antibodies. *Blood* **86**, 3189-3195.
257. Ricard, J., Meunier, J. C., Buc, J. (1974). Regulatory behaviour of monomeric enzymes. The mnemonical enzyme concept. *Eur. J. Biochem.* **49**, 195-208.
258. Richman, D. P., Gomez, C. M., Berman, P. W., Burres, S. A., Fitch, F. W., Arnason, B. G. W. (1980). Monoclonal anti-acetylcholine receptor antibodies can cause experimental myasthenia. *Nature* **286**, 738-739.
259. Robache-Gallea, S., Morand, V., Bruneau, J. M., Schoot, B., Tagat, E., Réalo, E., Chouaib, S., Roman-Roman, S. (1995). *In vitro* processing of human tumor necrosis factor- α . *J. Biol. Chem.* **270**, 23688-23692.
260. Rooney, C. P., Taggart, C., Coakley, R., McElvaney, N. G., O'Neill, S. J. (2001). Anti-Proteinase 3 antibody activation of neutrophils can be inhibited by alpha1-antitrypsin. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **24**, 747-754.
261. Rothe, G., Emmendörffer, A., Oser, A., Roesler, J., Valet, G. (1991). Flow cytometric measurement of the respiratory burst activity of phagocytes using dihydrorhodamine 123. *J. Immunol. Methods* **138**, 133-135.
262. Rudolph, R. (1990). Renaturation of recombinant, disulfide-bonded proteins from „inclusion bodies“. In *Modern methods in protein- and nucleic acid research*, Tschesche, H. (Hrsg.) S. 149-172. Walter de Gruyter, New York.
263. Rudolph, R., Lilie, H. (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* **10**, 49-56.
264. Ruoslahti, E., Yamaguchi, Y. (1991). Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* **64**, 867-869.
265. Russell, K. A., Fass, D. N., Specks, U. (2001). Antineutrophil cytoplasmic antibodies reacting with the pro form of proteinase 3 and disease activity in patients with Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis. *Arthritis Rheum.* **44**, 463-468.
266. Saari, H., Suomalainen, K., Lindy, O., Kontinen, Y. T., Sorsa, T. (1990). Activation of latent human neutrophil collagenase by reactive oxygen species and serine proteases. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **171**, 979-987.
267. Salih, H., Husfeld, L., Adam, D. (1997). Inhibitory effect of heparin on neutrophil phagocytosis and burst production using a new whole-blood cytofluorometric method for determination. *Eur. J. Med. Res.* **2**, 507-513.
268. Salvesen, G., Enghild, J. J. (1990). An unusual specificity in the activation of neutrophil serine proteinase zymogens. *Biochemistry* **29**, 5304-5308.
269. Salzet, M., Vieau, D., Stefano, G. B. (1999). Serpins: an evolutionary conserved strategy. *Immunol. Today* **20**, 541-544.
270. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning, A laboratory manual*, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
271. Sanger, F.S., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
272. Savage, C. O. S., Harper, L., Cockwell, P., Adu, D., Howie, A. J. (2000). ABC of arterial and vascular diseases. Vasculitis. *Br. Med. J.* **320**, 1325-1328.
273. Savage, C. O. S., Pottinger, B. E., Gaskin, G., Lockwood, C. M., Pusey, C. D., Pearson, J. D. (1991). Vascular damage in Wegener's granulomatosis and microscopic polyarteritis: presence of anti-endothelial cell antibodies and their relation to anti-neutrophil cytoplasm antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* **85**, 14-19.

274. Schechter, I., Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **27**, 157-162.
275. Schmitt, E., Guillon, J. M., Meinel, T., Mechulam, Y., Dardel, F., Blanquet, S. (1996). Molecular recognition governing the initiation of translation in *Escherichia coli*. A review. *Biochimie* **78**, 543-554.
276. Schwarting, A., Hagen, D., Odenthal, M., Brockmann, H., Dienes, H.-P., Wandel, E., Rumpelt, H.-J., Meyer zum Büschenfelde, K.-H., Galle, P. R., Mayet, W. (2000). Proteinase-3 mRNA expressed by glomerular epithelial cells correlates with crescent formation in Wegener's granulomatosis. *Kidney Int.* **57**, 2412-2422.
277. Scocchi, M., Skerlavaj, B., Romeo, D., Gennaro, R. (1992). Proteolytic cleavage by neutrophil elastase converts inactive storage proforms to antibacterial bactericins. *Eur. J. Biochem.* **209**, 589-595.
278. Sedgwick, J. D., Holt, P. G. (1983). A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells. *J. Immunol. Methods* **57**, 301-309.
279. Segelmark, M., Baslund, B., Wieslander, J. (1994). Some patients with anti-myeloperoxidase autoantibodies have a C-ANCA pattern. *Clin. Exp. Immunol.* **96**, 458-465.
280. Sharpe, R. J., Margolis, R. J., Askari, M., Amento, E. P., Granstein, R. D. (1988). Induction of dermal and subcutaneous inflammation by recombinant cachectin/tumor necrosis factor (TNF alpha) in the mouse. *J. Invest. Dermatol.* **91**, 353-357.
281. Shoenfeld, Y., Tomer, Y., Blank, M. (1995). A new experimental model for Wegener's granulomatosis. *Isr. J. Med. Sci.* **31**, 13-16.
282. Sibelius, U., Hattar, K., Schenkel, A., Noll, T., Csernok, E., Gross, W. L., Mayet, W. J., Piper, H. M., Seeger, W., Grimminger, F. (1998). Wegener's granulomatosis: anti-proteinase 3 antibodies are potent inducers of human endothelial cell signaling and leakage response. *J. Exp. Med.* **187**, 497-503.
283. Sköld, S., Rosberg, B., Gullberg, U., Olofsson, T. (1999). A secreted proform of neutrophil Proteinase 3 regulates the proliferation of granulopoietic progenitor cells. *Blood* **93**, 849-856.
284. Slifka, M. K., Antia, R., Whitmire, J. K., Ahmed, R. (1998). Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* **8**, 363-372.
285. Smedly, L. A., Tonnesen, M. G., Sandhaus, R. A., Haslett, C., Guthrie, L. A., Johnston, R. B., Henson, P. M., Worthen, G. S. (1986). Neutrophil-mediated injury to endothelial cells. Enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase. *J. Clin. Invest.* **77**, 1233-1243.
286. Smith, A. J. H., De Sousa, M. A., Kwabi-Addo, B., Heppell-Parton, A., Impey, H., Rabbitts, P. (1995). A site-directed chromosomal translocation induced in embryonic stem cells by Cre-loxP recombination. *Nature Genet.* **9**, 376-385.
287. Smith, R. J., Chosay, J. G., Dunn, C. J., Manning, A. M., Justen, J. M. (1996). ICAM-1 mediates leukocyte-endothelium adhesive interactions in the reversed passive Arthus reaction. *J. Leukoc. Biol.* **59**, 333-340.
288. Smyth, M. J., McGuire, M. J., Thia, K. Y. T. (1995). Expression of recombinant human granzyme B. A processing and activating role for dipeptidyl peptidase I. *J. Immunol.* **154**, 6299-6305.
289. Sorensen, M. A., Kurland, C. G., Pedersen, S. (1989). Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **207**, 365-377.
290. Specks, U., Fass, D. N., Fautsch, M. P., Hummel, A. M., Viss, M. A. (1996). Recombinant human proteinase 3, the Wegener's autoantigen, expressed in HMC-1 cells is enzymatically active and recognized by c-ANCA. *FEBS Lett.* **390**, 265-270.

-
291. Spector, N. L., Hardy, L., Ryan, C., Miller, W. H., Humes, J. L., Nadler, L. M., Luedke, E. (1995). 28-kDa mammalian heat shock protein, a novel substrate of a growth regulatory protease involved in differentiation of human leukemia cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 1003-1006.
292. Speer, C. P., Pabst, M. J., Hedegaard, H. B., Rest, R. F., Johnston jr., R. B. (1984). Enhanced release of oxygen metabolites by monocyte-derived macrophages exposed to proteolytic enzymes: activity of neutrophil elastase and cathepsin G. *J. Immunol.* **133**, 2151-2156.
293. Stegeman, C. A., Cohen Tervaert, J. W., de Jong, P. E., Kallenberg, C. G. (1996). Trimethoprim-sulfamethoxazole (co-trimoxazole) for the prevention of relapses of Wegener's granulomatosis. Dutch Co-Trimoxazole Wegener Study Group. *N. Engl. J. Med.* **335**, 16-20.
294. Stegeman, C. A., Cohen Tervaert, J. W., Sluiter, W. J., Manson, W. L., de Jong, P. E., Kallenberg, C. G. M. (1994). Association of chronic nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and higher relapse rates in Wegener granulomatosis. *Ann. Intern. Med.* **120**, 12-17.
295. Stein, R. L., Williams, J. C. (1985). Proteolytic inactivation of human leukocyte elastase. *Experientia* **41**, 638-640.
296. Stetson, C. A. (1951). Similarities in the mechanisms determining the Arthus and Schwartzman phenomena. *J. Exp. Med.* **94**, 347-358.
297. Stoffel, M. P., Csernok, E., Herzberg, C., Johnston, T., Carroll, S. F., Gross, W. L. (1996). Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against bactericidal/permeability increasing protein (BPI): a new seromarker for inflammatory bowel disease and associated disorders. *Clin. Exp. Immunol.* **104**, 54-59.
298. Stroud, R. M. (1974). A family of protein cutting proteins. *Scientific American* **231**, 74-88.
299. Stubbs, M. T., Renatus, M., Bode, W. (1998). An active zymogen: unravelling the mystery of tissue-type plasminogen activator. *Biol. Chem.* **379**, 95-103.
300. Studier, F. W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.* **219**, 37-44.
301. Sturrock, A. B., Franklin, K. F., Rao, G., Marshall, B. C., Rebentisch, M. B., Lemons, R. S., Hoidal, J. R. (1992). Structure, chromosomal assignment, and expression of the gene for proteinase-3. The Wegener's granulomatosis autoantigen. *J. Biol. Chem.* **267**, 21193-21199.
302. Sun, J., Fass, D. N., Viss, M. A., Hummel, A. M., Tang, H., Homburger, H. A., Specks, U. (1998). A proportion of proteinase 3 (PR3)-specific anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) only react with PR3 after cleavage of its N-terminal activation peptide. *Clin. Exp. Immunol.* **114**, 320-326.
303. Sweet, R. M., Eisenberg, D. (1983). Correlation of sequence hydrophobicities measures similarity in three-dimensional protein structure. *J. Mol. Biol.* **171**, 479-488.
304. Sylvestre, D. L., Ravetch, J. V. (1994). F_c-receptors initiate the Arthus reaction: redefining the inflammatory cascade. *Science* **265**, 1095-1098.
305. Sylvestre, D. L., Ravetch, J. V. (1996). A dominant role for mast cell F_c-receptors in the Arthus reaction. *Immunity* **5**, 387-390.
306. Szalai, A. J., Digerness, S. B., Agrawal, A., Kearney, J. F., Bucy, R. P., Niwas, S., Kilpatrick, J. M., Babu, Y. S., Volanakis, J. E. (2000). The Arthus reaction in rodents: species-specific requirement of complement. *J. Immunol.* **164**, 463-468.
307. Szymkowiak, C. H., Johnston, T. W., Csernok, E., Gross, W. L. (1996). Expression of the human Autoantigen of Wegener's granulomatosis (PR3) in a baculovirus expression system. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **219**, 283-289.

308. Taekema-Roelvink, M. E., van Kooten, C., Heemskerk, E., Schroeijers, W., Daha, M. R. (2000). Proteinase 3 interacts with a 111-kD membrane molecule of human umbilical vein endothelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**, 640-648.
309. Teixeira, M. M., Fairbairn, S. M., Norman, K. E., Williams, T. J., Rossi, A. G., Hellewell, P. G. (1994). Studies on the mechanisms involved in the inflammatory response in a reversed passive Arthus reaction in guinea-pig skin: contribution of neutrophils and endogenous mediators. *Br. J. Pharmacol.* **113**, 1363-1371.
310. Tessier, L. H., Sondermeyer, P., Faure, T., Dreyer, D., Benavente, A., Villeval, D., Courtney, M., Lecocq, J. P. (1984). The influence of mRNA primary and secondary structure on human IFN-gamma gene expression in *E. coli*. *Nucl. Acid Res.* **12**, 7663-7675.
311. Thomas, K.R., Capecchi, M.R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* **51**, 503-512.
312. Thompson, R. C., Blout, E. R. (1973). Restrictions on the binding of Proline-containing peptides to Elastase. *Biochemistry* **12**, 51-57.
313. Thompson, R. C., Blout, E. R. (1973). Dependence of the kinetic parameters for Elastase-catalyzed amide hydrolysis on the length of peptide substrates. *Biochemistry* **12**, 57-65.
314. Tkalcevic, J., Novelli, M., Phylactides, M., Iredale, J. P., Segal, A. W., Roes, J. (2000). Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. *Immunity* **12**, 201-210.
315. Tomer, Y., Gilburd, B., Blank, M., Lider, O., Hershkovich, R., Fishman, P., Ziegelman, R., Meroni, P.-L., Wiik, A., Shoenfeld, Y. (1995). Characterization of biologically active antineutrophil cytoplasmic antibodies induced in mice. *Arthritis Rheum.* **38**, 1375-1381.
316. Toomes, C., James, J., Wood, A. J., Wu, C. L., McCormick, D., Lench, N., Hewitt, C., Moynihan, L., Roberts, E., Woods, C. G., Markham, A., Wong, M., Widmer, R., Ghaffar, K. A., Pemberton, M., Hussein, I. R., Temtamy, S. A., Davies, R., Read, A. P., Sloan, P., Dixon, M. J., Thakker, N. S. (1999). Loss-of-function mutations in the cathepsin C gene result in periodontal disease and palmoplantar keratosis. *Nature Genet.* **23**, 421-424.
317. Topham, M. K., Carveth, H. J., McIntyre, T. M., Prescott, S. M., Zimmerman, G. A. (1998). Human endothelial cells regulate polymorphonuclear leukocyte degranulation. *FASEB J.* **12**, 733-746.
318. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
319. Tse, W. Y., Abadeh, S., Jefferis, R., Savage, C. O. S., Adu, D. (2000). Neutrophil FcγRIIIb allelic polymorphism in anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-positive systemic vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* **119**, 574-577.
320. Tse, W. Y., Abadeh, S., McTiernan, A., Jefferies, R., Savage, C. O. S., Adu, D. (1999). No association between neutrophil FcγRIIa allelic polymorphism and anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-positive systemic vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* **117**, 198-205.
321. Ulmer, M., Rautmann, A., Gross, W. L. (1992). Immunodiagnostic aspects of autoantibodies against myeloperoxidase. *Clin. Nephrol.* **37**, 161-168.
322. Varallyay, E., Pal, G., Patthy, A., Szilagy, L., Graf, L. (1998). Two mutations in rat trypsin confer resistance against autolysis. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **243**, 56-60.
323. Venge, P., Olsson, M. D. (1975). Cationic proteins of human granulocytes. VI. Effects on the complement system and mediation of chemotactic activity. *J. Immunol.* **115**, 1505-1508.
324. Victor, M., Weiss, J., Elsbach, P. (1981). Heparin inhibits phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* **32**, 295-299.

325. Vissers, M. C. M., George, P. M., Bathurst, I. C., Brennan, S. O., Winterbourn, C. C. (1988). Cleavage and inactivation of alpha 1-antitrypsin by metalloproteinases released from neutrophils. *J. Clin. Invest.* **82**, 706-711.
326. Vissers, M. C. M., Winterbourn, C. C. (1988). Activation of human neutrophil gelatinase by endogenous serine proteinases. *Biochem. J.* **249**, 327-331.
327. Voynick, I. M., Fruton, J. S. (1968). The specificity of dipeptidyl transferase. *Biochemistry* **7**, 40-44.
328. Watt, S. M., Burgess, A. W., Metcalf, D. (1979). Isolation and surface labeling of murine polymorphonuclear neutrophils. *J. Cell Physiol.* **100**, 1-22.
329. Watts, R. A., Carruthers, D. M., Scott, D. G. (1995). Epidemiology of systemic vasculitis: changing incidence or definition? *Semin. Arthritis Rheum.* **25**, 28-34.
330. Webb, L. M. C., Ehrenguber, M. U., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., Rot, A. (1993). Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7158-7162.
331. Wedmore, C. V., Williams, T. J. (1981). Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. *Nature* **289**, 646-650.
332. Wedmore, C. V., Williams, T. J. (1981). Platelet-activating factor (PAF), a secretory product of polymorphonuclear leukocytes, increases vascular permeability in rabbit skin. *Br. J. Pharmacol.* **74**, 916P-917P.
333. Wegener, F. (1939). Über eine eigenartige rhinogene Granulomatose mit besonderer Beteiligung des Arteriensystems und der Nieren. *Beitr. Path. Anat.* **109**, 36-68.
334. Weigert, M. J., Doherty, D. H., Best, E. A., Olins, P. O. (1996). Optimizing of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotech.* **7**, 494-499.
335. Weiner, S. R., Paulus, H. E., Weisbart, R. H. (1986). Wegener's granulomatosis in the elderly. *Arthritis Rheum.* **29**, 1157-1159.
336. Wetering van, S., Mannesse-Lazeroms, S. P., Dijkman, J. H., Hiemstra, P. S. (1997). Effect of neutrophil serine proteinases and defensins on lung epithelial cells. Modulation of cytotoxicity and IL-8 production. *J. Leukoc. Biol.* **62**, 217-226.
337. Wiedow, O., Lüdemann, J., Utecht, B. (1991). Elafin is a potent inhibitor of proteinase 3. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **174**, 6-10.
338. Wilharm, E., Parry, M. A. A., Friebel, R., Tschesche, H., Matschiner, G., Sommerhoff, C. P., Jenne, D. E. (1999). Generation of catalytically active Granzyme K from *Escherichia coli* inclusion bodies and identification of efficient Granzyme K inhibitors in human plasma. *J. Biol. Chem.* **274**, 27331-27337.
339. Williams, R. C., Staud, R., Malone, C. C., Payabyab, J., Byres, L., Underwood, D. (1994). Epitopes on proteinase-3 recognized by antibodies from patients with Wegener's granulomatosis. *J. Immunol.* **152**, 4722-4737.
340. Wilson, C.M. (1983). Staining of proteins on gels: Comparison of dyes and procedures. *Methods Enzymol.* **91**, 236-247.
341. Winkel van de, J. G., Capel, P. J. (1993). Human IgG receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol. Today* **14**, 215-221.
342. Witko-Sarsat, V., Cramer, E. M., Hieblot, C., Guichard, J., Nusbaum, P., Lopez, S., Lesavre, P., Halbwachs-Mecarelli, L. (1999). Presence of proteinase 3 in secretory vesicles: evidence of a novel, highly mobilizable intracellular pool distinct from azurophil granules. *Blood* **94**, 2487-2496.

-
343. Witko-Sarsat, V., Halbwachs-Mecarelli, L., Almeida, R. P., Nusbaum, P., Melchior, M., Jamaledine, G., Lesavre, P., Descamps-Latscha, B., Gabay, J. E. (1996). Characterization of a recombinant proteinase 3, the autoantigen in Wegener's granulomatosis and its reactivity with anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. *FEBS lett.* **382**, 130-136.
344. Witko-Sarsat, V., Lesavre, P., Lopez, S., Bessou, G., Hieblot, C., Prum, B., Noel, L. H., Guillevin, L., Ravaud, P., Sermet-Gaudelus, I., Timsit, J., Grünfeld, J.-P., Halbwachs-Mecarelli, L. (1999). A large subset of neutrophils expressing membrane proteinase 3 is a risk factor for vasculitis and rheumatoid arthritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**, 1224-1233.
345. Woude van der, F. J., Rasmussen, N., Lobatto, S., Wiik, A., Permin, H., van Es, L. A., van der Griessen, M., van der Herm, G. K. (1985). Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* **1**, 425-429.
346. Yang, J. J., Jennette, J. C., Falk, R. J. (1994). Immune complex glomerulonephritis is induced in rats immunized with heterologous myeloperoxidase. *Clin. Exp. Immunol.* **97**, 466-73.
347. Yang, J. J., Kettritz, R., Falk, R. J., Jennette, J. C., Gaido, M. L. (1996). Apoptosis of endothelial cells induced by the neutrophil serine proteinases proteinase 3 and elastase. *Am. J. Pathol.* **149**, 1617-1626.
348. Yang, J. J., Tuttle, R., Falk, R. J., Jennette, J. C. (1996). Frequency of anti-bacterial/permeability-increasing protein (BPI) and anti-azurocidin in patients with renal disease. *Clin. Exp. Immunol.* **105**, 125-131.
349. Zanetti, M., Gennaro, R., Romeo, D. (1995). Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS lett.* **374**, 1-5.
350. Zhang, S. P., Zubay, G., Goldman, E. (1991). Low-usage codons in *Escherichia coli*, yeast, fruit fly and primates. *Gene* **105**, 61-72.
351. Zhang, Y., Ramos, B. F., Jakschik, B. A. (1992). Neutrophil recruitment by tumor necrosis factor from mast cells in immune complex peritonitis. *Science* **258**, 1957-1959.
352. Zhao, M. H., Lockwood, C. M. (1996). Azurocidin is a novel antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in systemic vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* **103**, 397-402.
353. Zimmer, M., Medcalf, R. L., Fink, T. M., Mattamann, C., Lichter, P., Jenne, D. E. (1992). Three human elastase-like genes coordinately expressed in the myelomonocyte lineage are organized as a single genetic locus on 19pter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **15**, 614-62

7 Abkürzungen und chemische Formeln

| | |
|-------------------|---|
| A | Adenin |
| ACPA | Anti-zytoplasmatischer Autoantikörper (<i>anti cytoplasmic autoantibody</i>) |
| AECA | Anti-Endothel Autoantikörper (<i>anti-endothelial cell antibody</i>) |
| Ala | Alanin |
| ANA | Anti-nukleärer Autoantikörper |
| (c/p/a-) ANCA | (klassischer/perinukleärer/atypischer) zytoplasmatischer Anti-Neutrophilen-Autoantikörper (<i>classic/perinuclear/atypical anti neutrophil cytoplasmic autoantibody</i>) |
| AP | alkalische Phosphatase |
| Arg | Arginin |
| AS | Aminosäure |
| Asp | Aspartat |
| Azu | Azurozidin |
| α 1-AT | α 1-Antitrypsin |
| BCIP | 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat |
| Bg. | Bindegewebe |
| BPI | Bakterizides, Permeabilität steigerndes Protein (<i>bacterial permeability increasing protein</i>) |
| BSA | Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>) |
| C | Cytosin |
| CaCl ₂ | Calciumchlorid |
| Cat (C/G) | Cathepsin (C/G) |
| CFA | komplettes Freund's Adjuvans (<i>complete Freund's adjuvans</i>) |
| CML | chronisch myeloische Leukämie |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| CSS | Churg-Strauss-Syndrom |
| Cys | Cystein |
| Da | Dalton |
| dd. | Doppelt destilliert |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxy ribonucleic acid</i>) |
| DTE | Dithioerythritol |
| ECL | <i>enhanced chemoluminescence</i> |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylene diamine tetra acetic acid</i>) |
| ELAM 1 | <i>endothelial leukocyte adhesion molecule 1</i> |
| ELISA | Festphasenimmunoassay (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>) |
| ELISPOT | <i>enzyme linked immunospot assay</i> |
| FACS | Fluoreszenzzytometer/-metrie (<i>fluorescence activated cell sorter/sorting</i>) |
| FCS | Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>) |
| FITC | Fluoreszeinisothiocyanat |
| fMLP | Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin |
| FPLC | fast protein liquid chromatography |
| g | Gramm |
| g | Gravitationskonstante |

| | |
|--------------------------------------|--|
| G | Guanin |
| Glu | Glutamat |
| Gly | Glycin |
| GVL | <i>graft versus leukemia</i> |
| Gzm | Granzym |
| HCl | Salzsäure |
| HIC | Hydrophobe Interaktionschromatographie |
| His | Histidin |
| H ₂ O _{((d.)d.)} | Wasser ((doppelt) destilliert) |
| HRP | Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>) |
| IB | Einschlußkörperchen (<i>inclusion body</i>) |
| ICAM 1 | <i>intercellular adhesion molecule 1</i> |
| IEP | isoelektrischer Punkt |
| IFA | inkomplettes Freund's Adjuvans |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| Ile | Isoleucin |
| IMDM | Iscoves modifiziertes Dulbeccos Medium |
| IPTG | Isopropyl-β-D-Galaktosid |
| Kap. | Kapitel |
| kb | Kilobase(n) |
| kDa | Kilodalton |
| kV | Kilovolt |
| l | Liter |
| LB | Luria-Bertani (-Medium) |
| Leu | Leucin |
| LF | Laktoferrin |
| LCMV | Lymphozytärer Choriomeningitisvirus |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LTB ₄ | Leukotrien B ₄ |
| Lys | Lysin |
| M | Mol |
| MCS | <i>multiple cloning site</i> |
| ME | Mercaptoäthanol |
| MeOSuc-AAPV-pNA | Methoxysuccinyl-alanyl-alanyl-prolyl-valyl-paranitroanilid |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| min | Minute(n) |
| ml | Milliliter |
| MPA | mikroskopische Polyangiitis |
| MPO | Myeloperoxidase |
| MW | Molekulargewicht |
| μF | Mikrofarad |
| μl | Mikroliter |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaHCO ₃ | Natriumhydrogencarbonat |
| NaOAc | Natriumacetat |
| NBT | Nitroblautetrazolium |
| (h) NE | (humane) Neutrophilen-Elastase |
| NF-κB | <i>nuclear factor kappa B</i> |
| ng | Nanogramm |
| nm | Nanometer |
| OD | optische Dichte |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>) |
| P. c. | <i>Panniculus carnosus</i> |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>) |

| | |
|------------|--|
| PFA | Paraformaldehyd |
| pg | Pikogramm |
| Phe | Phenylalanin |
| pI | isoelektrischer Punkt |
| PMA | Phorbolmyristataacetat |
| PMN | polymorphonukleäre Zelle |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylflourid |
| pNPP | p-Nitrophenylphosphat |
| POD | Peroxidase |
| (r)(m) PR3 | (rekombinante)(murine) Proteinase-3 |
| Pro | Prolin |
| PVDF | Polyvinylidenflourid |
| rbs | Ribosomenbindungsstelle |
| RPA | reverse, passive Arthus-Reaktion |
| RPGN | rapid progressive Glomerulonephritis |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde |
| s. | siehe |
| SDS | Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>) |
| s. F. | subkutanes Fettgewebe |
| Ser | Serin |
| SLPI | <i>secretory leukocyte protease inhibitor</i> |
| SOD | Superoxiddismutase |
| T | Thymin |
| Tab. | Tabelle |
| TBS | Tris-gepufferte Salzlösung (<i>tris buffered saline</i>) |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin |
| TGFβ | <i>transforming growth factor beta</i> |
| Thr | Threonin |
| TNFα | Tumornekrosefaktor α |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| U | <i>unit</i> |
| ÜNK | Übernachtkultur |
| Val | Valin |
| VCAM | <i>vascular adhesion molecule 1</i> |
| V | Volt |
| WG | Wegener'sche Granulomatose |
| WT | Wildtyp |
| ZNS | Zentralnervensystem |

medizinische Kürzel für das Gesamtprofil von Blut:

| | |
|------------|---------------------------|
| AP | alkalische Phosphatase |
| BILI | Bilirubin gesamt |
| BZ | Glucose (Blutzucker) |
| CA | Calcium |
| Ca/Phos.-Q | Calcium/Phosphor-Quotient |
| CHE | Cholinesterase |
| CHOL | Cholesterin |
| DBIL | Bilirubin direkt |
| EIW | Eiweiß gesamt |
| FE | Eisen |
| HB | Hämoglobin |
| HK | Hämatokrit |
| HST | Harnstoff |
| IBIL | Bilirubin indirekt |
| KA | Kalium |
| KREA | Kreatinin |

| | |
|------|--|
| MCH | Hämoglobin in Erythrozyten |
| MCHC | Hämoglobin-Konzentration in Erythrozyten |
| MCV | mittleres Erythrozytenvolumen |
| MG | Magnesium |
| NA | Natrium |
| PHOS | Phosphor |
| THRO | Thrombozyten |
| TRI | Triglyceride |

8 Anhang

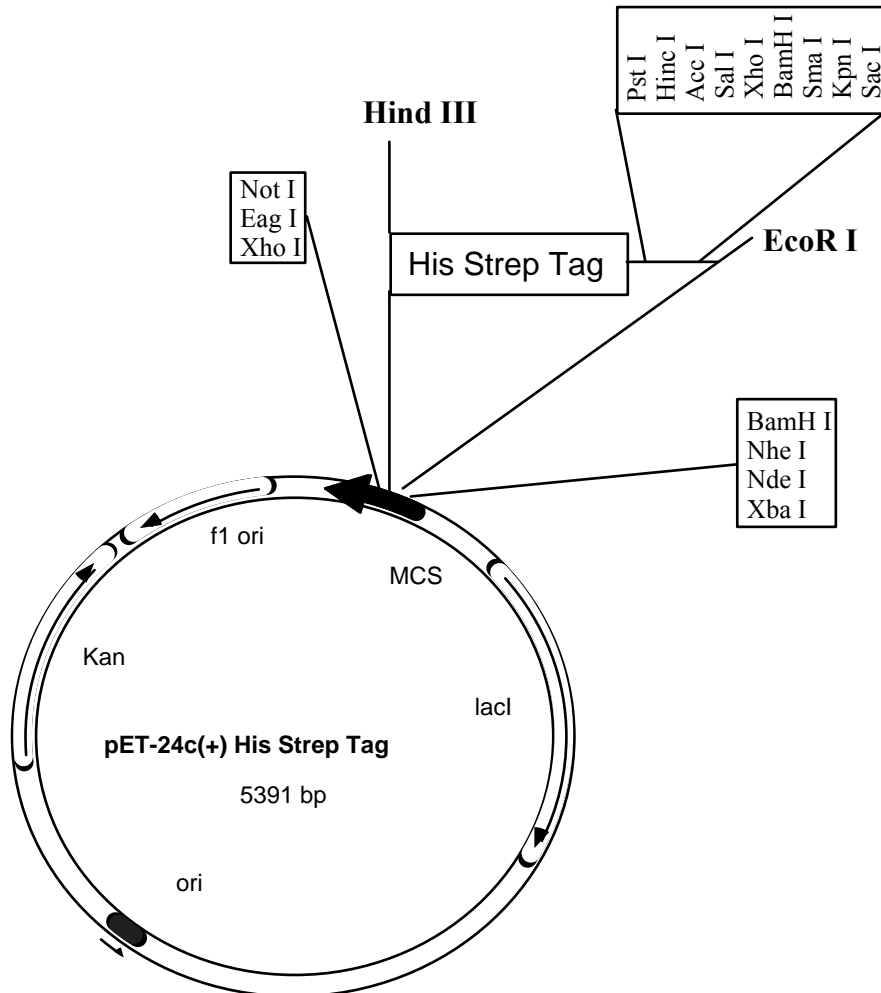


Abb. 7.1: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pET24cHST für die rekombinante Expression muriner PR3 in *E. coli*.

Das dargestellte Konstrukt ist ein Derivat von pET24c (+) (Novagen), dem zwischen den Restriktionsstellen *EcoR* I und *Hind* III (fett gedruckt) zusätzliche Restriktionsschnittstellen und ein *His-Strep-tag* eingefügt wurden (Daniel Pilat, Dissertation 1996). Die Klonierung der Sequenz von mPR3 erfolgte zwischen den Restriktionsstellen 5'-*Nde* I-3'-*Kpn* I. Die *His-Strep*-Sequenz wurde nicht translatiert.

Kan: Kanamycinresistenzgen, ori: Replikationsursprung (*origin of replication*), lacI: *lac*-Repressor, MCS: *multiple cloning site*.

Anhang

9 18 27 36 45 54
5' CA↑T ATG GAA ATC GTG GGC GGC CAC GAA GCG CGC CCT CAC TCT CGT CCG TAC GTA
1 M E I V G G H E A R P H S R P Y V

63 72 81 90 99 108
GCA TCC CTG CAG CTG AGC AGG TTC CCT GGG AGC CAC TTC TGT GGT GGC ACC CTG
18 A S L Q L S R F P G S H F C G G T L

117 126 135 144 153 162
ATC CAC CCG AGA TTC GTG CTG ACA GCC GCC CAC TGC CTG CAG GAC ATC TCC TGG
36 I H P R F V L T A A H C L Q D I S W

171 180 189 198 207 216
CAG CTT GTG ACA GTG GTG CTG GGT GCC CAC GAC CTG CTG AGC TCG GAG CCT GAG
54 Q L V T V V L G A H D L L S S E P E

225 234 243 252 261 270
CAG CAG AAG TTC ACC ATC AGT CAG GTC TTC CAG AAC AAT TAC AAC CCC GAG GAG
72 Q Q K F T I S Q V F Q N N Y N P E E

279 288 297 306 315 324
AAC CTT AAT GAC GTG CTT CTC CTC CAG CTA AAC CGG CCA GCC TCC CTG GGC AAG
90 N L N D V L L L Q L N R P A S L G K

333 342 351 360 369 378
GAG GTG GCG GTG GCT TCT CTG CCC CAG CAG GAC CAG ACT CTG TCC CAG GGC ACC
108 E V A V A S L P Q Q D Q T L S Q G T

387 396 405 414 423 432
CAG TGC CTG GCC ATG GGC TGG GGT CGC CTG GGC ACC CAA GCA CCC ACG CCC CGT
126 Q C L A M G W G R L G T Q A P T P R

441 450 459 468 477 486
GTG CTG CAG GAA CTG AAC GTC ACG GTG GTC ACC TTC CTA TGC CGG GAA CAC AAC
144 V L Q E L N V T V V T F L C R E H N

495 504 513 522 531 540
GTG TGC ACG CTG GTG CCA CGG AGG GCA GCA GGC ATA TGC TTC GGA GAC TCG GGC
162 V C T L V P R R A A G I C F G D S G

549 558 567 576 585 594
GGC CCC TTG ATC TGC AAT GGC ATT CTT CAT GGA GTG GAC TCC TTC GTG ATC CGC
180 G P L I C N G I L H G V D S F V I R

Anhang

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-----|------|-----|-----|-----|
| | 603 | 612 | 621 | 630 | 639 | 648 | | | | | | | | | | | | |
| | GAA | TGC | GCC | TCC | CTC | CAG | TTC | CCT | GAT | TTC | TTC | GCC | CGG | GTG | TCC | ATG | TAT | GTG |
| 198 | E | C | A | S | L | Q | F | P | D | F | F | A | R | V | S | M | Y | V |
| | 657 | 666 | 675 | 684 | | | | | | | | | | | | | | |
| | GAC | TGG | ATT | CAA | AAC | GTG | CTG | CGG | GGC | GCA | GAG | CCC | <i>TAA</i> | GGT | AC↑C | 3' | | |
| 216 | D | W | I | Q | N | V | L | R | G | A | E | P | * | | | | | |

Abb. 7.2: Nukleotid- und Aminosäuresequenz muriner PR3 in mPR3pET24c/F3a.

Die Aminosäuresequenz ist im Einbuchstabencode dargestellt. Die im Zuge der Kodonoptimierung veränderten Nukleotide sind fett kursiv dargestellt. Pfeile (↑) in der Nukleotidsequenz deuten die Schnittstellen der Klonierungsrestriktionsstellen von *Nde* I (5'-Ende) und *Kpn* I (3'-Ende) an. Das N-terminale Propeptid des Zymogens ist fett dargestellt. Das Stopcodon ist durch einen Stern (*) angedeutet. Das Scherensymbol (⌘) in der Aminosäuresequenz symbolisiert die in Kap. 4.5.2 beschriebene Spaltstelle.

Lebenslauf

Name Pfister
Vorname Heiko
Geburtsdatum 25. 06. 1969
Geburtsort Tauberbischofsheim

Schulbesuch

1975-1979 Grundschule Ost, Tauberbischofsheim
1979-1988 Matthias-Grünewald-Gymnasium, Tauberbischofsheim

1988-1989 Grundwehrdienst in Tauberbischofsheim
1990 Auslandsaufenthalt

Studium

1991-1997 Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Juni 1996 Diplomprüfung
Juli 1996–Juli 1997 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik der Universität Würzburg im Arbeitskreis von Dr. Thomas Raabe mit dem Thema: Etablierung und Charakterisierung pilzkörperspezifischer Gal4-Enhancer-Trap-Linien in *Drosophila melanogaster*
seit November 1997 Forschungsarbeit im Rahmen der Promotion am Max-Planck-Institut für Neurobiologie im Arbeitskreis von Dr. med. habil. Dieter E. Jenne mit dem Thema:
Wegener'sche Granulomatose: Untersuchungen zur Rolle zytoplasmatischer Neutrophilen-Autoantikörper und deren Zielantigen Proteinase 3 sowie Neutrophilen-Elastase bei Entzündungsprozessen in der Maus

Publikationen

Aus der Diplomarbeit an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg ging hervor:

Melzig, J., Rein, K.-H., Schäfer, U., Pfister, H., Jäckle, H., Heisenberg, M., Raabe, T. (1998). A protein related to p21-activated kinase (PAK) that is involved in neurogenesis in the Drosophila adult central nervous system. *Curr. Biol.* **8**, 1223-1226.

Aus der vorliegenden Dissertation ging hervor:

Wilharm, E., Pfister, H., Jenne, D. (1999). Recombinant expression, renaturation, and characterization of human granzyme K. *Immunobiology* **200**, 385-386.

Ein Manuskript wird voraussichtlich mit dem Titel eingereicht bei *Nature Med.*:

Pfister, H., Ollert, M., Fröhlich, L., Quintanilla-Fend, L., Specks, U., Jenne, D.: Wegener's granulomatosis: anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) have a pathogenic impact *in vivo*.